目次

2.6.2 薬理試験の概要文....4
2.6.2.1 緒言及びまとめ....4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験....6
2.6.2.2.1 in vitro の作用....7
2.6.2.2.2 動物モデルにおける有効性....9
2.6.2.2.3 その他の効力を裏付ける試験....13
2.6.2.3 副次的薬理試験....13
2.6.2.3.1 evolomucab の脳及び認知機能に対する潜在的影響....14
2.6.2.3.2 PCSK9 が他の LDLR ファミリータンパク質に作用する可能性....17
2.6.2.3.3 C 型肝炎感染性において予想される PCSK9 阻害の影響....21
2.6.2.3.4 インスリン抵抗性及び糖尿病リスクに対して予想される PCSK9 阻害の影響....22
2.6.2.3.5 スタチンによるミオパチーのメカニズムと PCSK9 阻害との関連....23
2.6.2.3.6 PCSK9 の阻害による血漿リポ蛋白脂質の最終代謝及び肝胆道系及び消化管に対する影響の可能性....24
2.6.2.3.7 PCSK9 阻害及び血清中 LDL-C 低下が免疫機能等の肝外系に影響を及ぼす可能性....26
2.6.2.3.8 PCSK9 以外のサブチリシンプロテアーゼへの evolocumab の結合親和性評価....28
2.6.2.4 安全性薬理試験....28
2.6.2.4.1 テレメトリーを装着した覚醒カニクイザルにおける evolocumab の単回静脈内投与による心血管系作用についての安全性薬理試験（呼吸数測定及び神経行動学的評価を含む）（110150 試験）....29
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験....29
2.6.2.6 考察及び結論....30
2.6.2.7 参考文献....31

表一覧

表 2.6.2-1 効力を裏付ける試験の一覧....5
表 2.6.2-2 非臨床安全性薬理試験....28

図一覧

図 2.6.2-1 evolocumab 及びメビノリンが HepG2 細胞の総 LDLR 濃度に及ぼす作用....8
図 2.6.2-2 ハムスターにおける evolocumab の血清 non-HDL-C に対する作用....10
図 2.6.2-3 evolocumab 30 mg/kg を皮下投与後のハムスターにおける血清中薬物濃度及び LDL-C 濃度の実測値（中抜き記号）及びモデル予測値（s1 及び s2 曲線）の推移....11
図 2.6.2-4 ハムスターにおける evolocumab の肝臓 LDLR 蛋白濃度に対する作用....12
図 2.6.2-5 カニクイザルにおける evolocumab の血清 LDL-C に対する作用....13
図 2.6.2-6 LDL 受容体ファミリータンパク質....18
図 2.6.2-7 LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント....18

略語・用語一覧

Abbreviation or Term	Definition/Explanation
AD	alzheimer disease（アルツハイマー病）
AERS	Adverse Event Reporting System（有害事象報告システム）
AMG 145	evolocumab
ApoE	apolipoprotein E（アポリポ蛋白 E）
ApoER2	apolipoprotein E receptor 2（アポリポ蛋白 E 受容体 2）
APP	amyloid beta-protein precursor（β部位アミロイド前駆体蛋白）
Asn	asparagine（アスパラギン）
Asp	aspartic acid（アスパラギン酸）
Aβ	amyloid beta-peptide（アミロイドβペプチド）
BACE1	beta-site amyloid beta A4 precursor protein-cleaving enzyme 1（β部位アミロイド前駆体蛋白切断酵素 1）
BBB	blood brain barrier（血液脳関門）
CNS	central nervous system（中枢神経系）
EC_{50}	50% effective concentration（50%最大濃度）
EDL	extensor digitorum longus muscle（長趾伸筋）
EGF	epidermal growth factor（上皮成長因子）
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素結合免疫測定法）
ENaC	epithelial Na channel（上皮性ナトリウムチャネル）
FDA	Food and Drug Administration（米国食品医薬局）
FPLC	fast protein liquid chromatography（高速タンパク質液体クロマトグラフィー）
Glu	glutamic acid（グルタミン酸）
HbA1c	hemoglobin A1c（血中グルコース及び糖化ヘモグロビン）
HCV	hepatitis C virus（C 型肝炎ウイルス）
HMG CoA	hydroxymethylglutaryl-coenzyme A（ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A）
HRP	streptavidin-horse radish peroxidase
IC_{50}	50% inhibitory concentration（50%阻害濃度）
IgG2	Immunoglobulin G2（免疫グロブリン G2）
KLH	keyhole limpet hemocyanin（キーホールリンペットヘモシアニン）
LDL	low density lipoprotein（低比重リポ蛋白）
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol（低比重リポ蛋白コレステロール）
LDLR	low density lipoprotein receptor（低比重リポ蛋白受容体）
Leu	leucine（ロイシン）
LOF	loss of function（機能喪失）
LRP's	LDL-receptor related protein (LDLR 関連受容体)
non-HDL-C	non high density lipoprotein cholesterol（非高比重リポ蛋白コレステロール）
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9（プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型）
PD	pharmacodynamics（薬力学）
PK	pharmacokinetics（薬物動態）
PR	PR interval（PR 間隔；心電図における房室伝道時間）
Q4W	once every 4weeks（4 週に 1 回）
QRS	QRS interval（QRS 間隔；心電図における心室収縮時間）
QT_C	corrected QT interval（QTc 間隔；心拍周期の補正をした QT 時間）
SNP	single nucleotide polymorphisms（一塩基変異多型）
SorLA	sortilin（ソルチリン）
SPR	surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
TC	total cholesterol（総コレステロール）
TDAR	T cell - dependent antibody response（T 細胞依存性抗体反応）
Tyr	tyrosine（チロシン）

Abbreviation or Term	Definition/Explanation
VLDL-C	very low density lipoprotein cholesterol（超低比重リポ蛋白コレステロール）
VLDLR	very low density lipoprotein receptor（超低比重リポ蛋白受容体）

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　緒言及びまとめ

evolocumab（AMG145）は、ヒトプロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型（PCSK9）に対する高親和性の遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体であり、PSCK9 と低比重リポ蛋白受容体（LDLR）の相互作用を阻害する。

evolocumab の *in vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験を表 2.6.2-1 に示し、2.6.2.2.1 項及び 2.6.2.2.2 項において詳細に考察する。要約すると、evolocumab はヒト、カニクイザル、並びにハムスターの PCSK9 と高い親和性で結合した（それぞれ K_D= 16、8、14 pmol/L）。evolocumab は、PCSK9 の LDLR への結合を用量依存的に阻害し、培養 HepG2 細胞（ヒト肝細胞株）において、PCSK9 による低比重リポ蛋白（LDL）取り込み量の減少を抑制した。evolocumab 及び HMG CoA 還元酵素阻害薬を併用して HepG2 細胞を処理すると、いずれか一方で処理した場合よりも LDLR 蛋白濃度が上昇した。ハムスターに evolocumab を *in vivo* で投与すると、肝臓の LDLR 蛋白濃度が上昇し、血清中の非高比重リポ蛋白コレステロール（non-HDL-C）及び総コレステロールが低下した。雄性カニクイザルに evolocumab を *in vivo* で投与すると、血清中の LDL-C 及び総コレステロールが低下した。

表 2.6.2-1　効力を裏付ける試験の一覧

試験番号	試験の標題	状態
in vitro		
R20080178	ヒト、カニクイザル、ハムスター、マウスの PCSK9 に対する AMG145 の結合活性	最終報告書
R20080177	LDLR と PCSK9 の結合測定における AMG145 と 31H4.2 の In Vitro IC_{50} 測定	最終報告書
R20080176	HepG2 細胞の LDL 取り込み測定における AMG145 と 31H4.2 の In Vitro EC_{50} 測定	最終報告書
R20080222	HepG2 細胞の LDL 受容体濃度に対する抗 PCSK9 抗体とスタチン併用の作用	最終報告書
in vivo		
R20080179	ゴールデンシリアンハムスターにおける血清コレステロールと肝臓 LDLR の調節に対する AMG145 単回皮下投与の作用	最終報告書
R20090025	カニクイザルの血清脂質に対する AMG145 単回皮下投与の作用	最終報告書
付加的 *in vivo*		
R20090001	アデノ随伴ウイルスによってヒト PCSK9 発現させた雄性 C57Bl/6 マウスにおける、抗 PCSK9 抗体 1A12、23B5、及び AMG145 のコレステロール低下作用	最終報告書
R20090266	雄性カニクイザルの血清コレステロールに対する 8A3、23B5、及び AMG145 の作用	最終報告書
R20100042	アデノ随伴ウイルスによってヒト PCSK9 を発現させた雄性 C57Bl/6 マウスにおける、抗 PCSK9 抗体 8A3、1A12、9C9、及び AMG145 のコレステロール低下作用	最終報告書
R20110022	雄性カニクイザルの血清脂質に対する AMG 492 単回皮下投与の作用	最終報告書

注：31H4.2 は R20080177 試験及び R20080176 試験において研究目的のために使用された抗 PCSK9 モノクローナル抗体である。AMG 145 は evolocumab に付けられた以前の名称である。

付加的 in vivo 試験において、evolocumab は 1A12、23B5、8A3、9C9、並びに AMG 492 といった他の PCSK9 抗体の PK/PD を評価する際の対照分子として用いられた。それらどの試験においても、evolocumab は以前の試験と極めて類似した成績を示しており，薬理学的又は安全性の面から新たな情報は得られていない。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

in vitro の結合試験において、evolocumab はヒト PCSK9 に対して高い結合親和性を示した（K_D = 16 pmol/L）（報告書 R20080178）。evolocumab のカニクイザルの PCSK9 及びハムスター PCSK9 に対する結合親和性は、ヒトの PCSK9 に対する結合親和性と同等であったが、マウスの PCSK9 に対しては，低い親和性を示した（K_D = 17000 pmol/L）（報告書 R20080178）。

酵素結合免疫測定法（ELISA）では、evolocumab はヒト PCSK9 とヒト LDLR との相互作用を阻害した（50%阻害濃度［IC_{50}］= 1.94 ± 0.32 nmol/L［平均 ± SD、n = 3］）（報告書 R20080177）。

PCSK9 と LDLR との相互作用を阻害する作用から予想される通り、evolocumab は、培養 HepG2 細胞（ヒト肝細胞株）における LDLR 蛋白濃度を上昇させ（報告書 R20080222）、HepG2 細胞への LDL-C 取り込みを増加させた（50%最大濃度［EC_{50}］= 129.6 ± 22.3 nmol/L［平均 ± SD、n = 3］）（報告書 R20080176）。

スタチン（ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A［HMG CoA］還元酵素阻害薬）は、高コレステロール血症治療薬である（Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration［CTTC］, 2010）。市販のスタチンであるメビノリンは、予測されたとおり、培養 HepG2 細胞における LDLR 蛋白濃度の増加を引き起こした（報告書 R20080222）。evolocumab とメビノリンの併用は、evolocumab 単独あるいはメビノリン単独と比較して、LDLR 蛋白をより増加させた。

evolocumab の *in vivo* における作用をハムスター及びカニクイザルで評価した。ハムスターでは、evolocumab の投与により肝臓中の LDLR 蛋白濃度が増加し、非高比重リポ蛋白コレステロール（non-HDL-C: LDL-C と超低比重リポ蛋白コレステロール［VLDL-C］の合計）の血清中濃度が有意に低下した。カニクイザルでは肝臓中の LDLR 蛋白に対する作用は評価しなかったが、evolocumab の投与により、LDL-C が有意に低下した（報告書 R20080179 及び R20090025）。

ハムスターでは、evolocumab の *in vivo* 投与により、高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C）の血清中濃度が低下した（報告書 R20080179）。ハムスターではヒトと異なり、HDL は LDLR のリガンドであることが知られている（Goulinet and Chapman, 1993）。

カニクイザルにおいて、evolocumab の SC 単回投与（0.05、0.2、0.5、3、10、30 mg/kg）が血清中リポ蛋白に及ぼす作用について検証した（報告書 R20090025 及び 111322 試験［2.6.4.1.1.1.1 項］）。evolocumab は、0.05 mg/kg 群を除く全投与群で LDL-C の平均値を低下させた（P < 0.01）。その後、LDL-C はベースラインの水準に回復し、回復に要した時間（効果持続時間）は用量に依存していた。カニクイザルでは、evolocumab の投与に伴い HDL-C あるいはトリグリセリドは変化しなかった。0.2 mg/kg 以上の用量では、血清 PCSK9 は速やかに低下し、投与から 1 日以内に定量限界を下回った。非結合 PCSK9 の低下後、LDL-C の平均値が最低値まで低下した（投与 1 週間後で約 80%）。PCSK9 濃度がベースラインの水準に回復したのは LDL-C がベースラインの水準に回復したのと同時期であった。

PCSK9 阻害後の肝臓中 LDLR 蛋白濃度上昇及び血清コレステロールの低下は、PCSK9 機能喪失型マウスモデル（Graham et al, 2007、Rashid et al, 2005）及び PCSK9 機能喪失型突然変異を持つ被験者（Cohen et al, 2006）の表現型と一致している。

in vitro 及び *in vivo* 試験の詳細を以下に示す。

2.6.2.2.1 in vitro の作用

2.6.2.2.1.1 異なる動物種における evolocumab の PCSK9 に対する結合親和性評価（報告書 R20080178）

evolocumab のヒト、カニクイザル、ハムスター、マウスの PCSK9 に対する結合親和性を KinExA 及び BIAcore®平衡結合アッセイにより評価した。ヒト、カニクイザル、ハムスター、マウスの PCSK9 に対する結合の K_D 値は、それぞれ約 16、8、14、17,000 pmol/L であった。

2.6.2.2.1.2 ヒト PCSK9 とヒト LDLR との結合に関する evolocumab の ELISA 法による阻害活性評価（報告書 R20080177）

野生型（WT）ヒト PCSK9 あるいは D374Y PCSK9 機能獲得型突然変異株（Kwon et al, 2008、Cunningham et al, 2007、Fisher et al, 2007）とヒト LDLR との結合に対する evolocumab の阻害活性を，ELISA により測定した。D374Y PCSK9 を使用した ELISA では、極めて安定的で高い感受性が得られた。

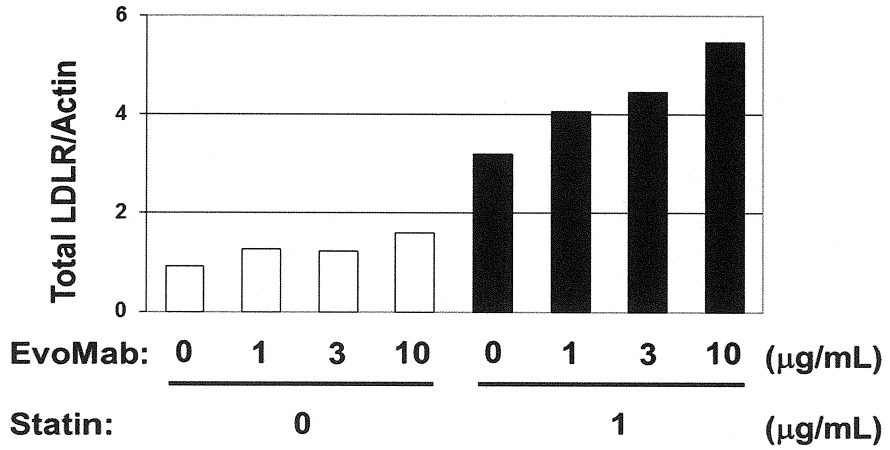
要約すると、LDLR 蛋白を、384 ウェルプレートのウェルに固相化し、様々な濃度の evolocumab とともにビオチン化 PCSK9（あるいはビオチン化 D374Y PCSK9）をインキュベートしてウェルに添加した。シグナル検出には、streptavidin-horse radish peroxidase（HRP）及び HRP 基質を使用した。evolocumab の IC_{50} 値は、WT PCSK9 では 1.94 ± 0.32 nmol/L（平均 ± SD、n = 3）、D374Y PCSK9 では 0.25 ± 0.16 nmol/L（n = 3）であった。LDLR に対する D374Y PCSK9 の結合親和性は WT PCSK9 の 5～30 倍であるため（Kwon et al, 2008、Cunningham et al, 2007、Fisher et al, 2007）、本 ELISA においては、WT PCSK9 の 1/5 の濃度の D374Y PCSK9 で、LDLR に対する適切な結合活性が得られた。この、試験に用いた WT PCSK9 と D374Y PCSK9 の濃度差が、それぞれを用いた場合における evolocumab の IC_{50} 値の差の一因であると考えられる。

2.6.2.2.1.3 培養細胞における LDLR 蛋白濃度に対する evolocumab の作用（スタチン併用及び非併用時）（報告書 R20080222）

evolocumab による培養細胞中の LDLR 増加作用（PCSK9 の LDLR に対する結合を阻害することによると思われる作用）を測定した。HepG2 細胞を様々な濃度の evolocumab とインキュベートし、抗 LDLR 抗体を用いて細胞中の全 LDLR を Western hybridization 法により測定した。図 2.6.2-1 に示すように、HepG2 細胞を 1、3、あるいは 10 μg/mL の evolocumab と 48 時間インキュベートすることにより、溶媒で処理した細胞を培養した場合と比較してわずかではあるが LDLR 蛋白濃度が上昇した。細胞表面 LDLR 蛋白濃度をフローサイトメトリーで測定した場合にも同様の応答が認められた。

スタチンは、コレステロール生合成経路における律速酵素である HMG CoA 還元酵素の低分子阻害薬であり、高コレステロール血症の治療に用いられている（2.5.1.3 項）。肝臓の HMG CoA 還元酵素の阻害により肝細胞のコレステロール濃度が大幅に低下し、また、肝臓 LDLR 発現量の増加や PCSK9 の発現量及び血中濃度の上昇が引き起こされる（Careskey et al, 2008、Mayne et al, 2008、Dubuc et al, 2004）。この反応は培養肝細胞で再現することができ、スタチンと evolocumab を併用した場合の影響に関する検討が可能である。

HepG2 細胞をスタチンであるメビノリン（1 μg/mL）と 48 時間インキュベートしたところ、溶媒で処理した細胞と比較して細胞中の全 LDLR 蛋白濃度が上昇し、培地への PCSK9 分泌量（ELISA で測定）も 1.39 ± 0.20 倍に増加した（P = 0.08、n = 3）。1 μg/mL のメビノリンを 1、3、あるいは 10 μg/mL の evolocumab とともにインキュベートすると、細胞中全 LDLR 蛋白濃度は、いずれかの一方の薬剤で培養した場合と比較して上昇した（図 2.6.2-1）。細胞表面 LDLR 蛋白濃度をフローサイトメトリーで測定したときにも同様の結果が得られた。evolocumab 及びスタチン併用により、肝臓 LDLR 蛋白濃度が相加的に上昇することが、培養肝細胞において示された。



様々な濃度の evolocumab を，単独あるいはスタチンであるメビリノンとともに HepG2 細胞に添加して 48 時間インキュベートした。総 LDLR 蛋白濃度を Western hybridization 法により測定して β-アクチン濃度で補正し，薬剤未処置細胞の LDLR/アクチン比を 1 として表した。出典：報告書 R20080222

図 2.6.2-1　evolocumab 及びメビノリンが HepG2 細胞の総 LDLR 濃度に及ぼす作用

2.6.2.2.1.4　細胞 LDL 取り込みにおける evolocumab の作用（報告書 R20080176）

in vitro において、evolocumab が細胞の LDL 取り込みに与える影響を評価した。evolocumab により刺激される細胞中 LDLR の増加（2.6.2.2.1.3 項）は、LDL 取り込みの増加をもたらすと予測される。本評価では、HepG2 細胞による蛍光標識 LDL の取り込みを測定した。WT PCSK9 又は D374Y PCSK9 の添加により（2.6.2.2.1.2 項）、LDLR の減少並びに細胞への蛍光標識 LDL の取り込み量の減少が観察された。PCSK9 あるいは D374Y PCSK9 を、様々な濃度の evolocumab とインキュベートした後に添加すると、蛍光標識 LDL の取り込み阻害は抑制された。50%回復濃度（すなわち、PCSK9 あるいは D374Y PCSK9 による作用の阻害が最大値の 50%になる evolocumab の濃度）（EC_{50}）は、PCSK9 で 129.6 ± 22.3 nmol/L（平均 ± SD、n = 3）、D374Y PCSK9 で 12.7 ± 4.0 nmol/L（n = 4）であった。本評価系において適切な LDL 取り込み阻害を示す D374Y PCSK9 の濃度は、WT PCSK9 の 1/10 であった。これは、LDLR に対する D374Y PCSK9 の結合親和性が WT PCSK9 の 5～30 倍であるため（2.6.2.2.1.2 項）と考えられる。

2.6.2.2.2 動物モデルにおける有効性

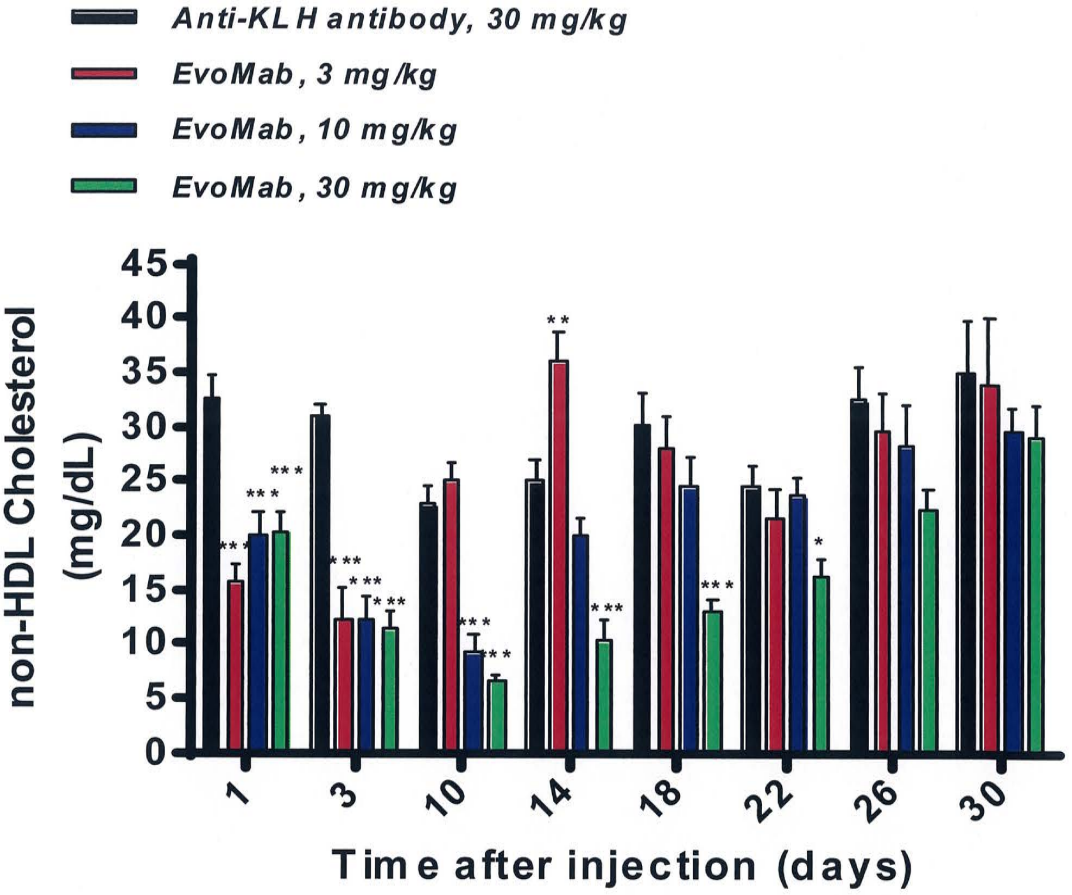
2.6.2.2.2.1 ゴールデンシリアンハムスターにおける evolocumab 投与の用量反応評価（報告書 R20080179）

ハムスターは non-HDL-C の血清中濃度の測定が可能であり、また evolocumab はハムスターの PCSK9 に対して高い親和性を持つため（K_D=14 pmol/L［2.6.2.2.1.1 項］）、コレステロール低下効果を評価するのに有用なモデルである。ハムスターに evolocumab（3、10、あるいは 30 mg/kg）を単回 SC 投与した。対照群には、抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）ヒト IgG2 モノクローナル抗体（30 mg/kg）を投与した。その 1、3、10、14、18、22、26、あるいは 30 日後、午前中 4 時間の絶食後にハムスターを屠殺し、血液及び肝臓サンプルを採取した。臨床分析装置及び高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）により血清中脂質を測定し、リポ蛋白のクラスを確認した。ふたつの測定法で結果は同様であった。evolocumab 投与群のハムスターでは対照群のハムスターと比較して、血清中 non-HDL-C はおおむね用量に関連して顕著に低下していた（図 2.6.2-2）。すべての用量の ecolocumab により、non-HDL-C は投与 3 日に 60%～70%低下した。evolocumab の 3、10、並びに 30 mg/kg 投与群では、それぞれ投与 10、14 並びに 26 日の non-HDL-C 値は、対照群との有意差は認められず、対照群と同等の水準であった（図 2.6.2-2）。このことは、血清 non-HDL-C の低下が可逆的であることを示している。このように、いずれの用量においても効果は投与 3 日後にほぼ最大となったが、その持続期間は用量に依存していた。evolocumab 30 mg/kg 皮下投与後の血清中薬物濃度と血清中 LDL-C 濃度の変化を、モデルからシミュレーションした曲線と共に、図 2.6.2-3 に示す。evolocumab 投与後、血清中 LDL-C 濃度は速やかに減少し、投与後 3 日から 10 日の間に最低レベルに達した。その後、LDL-C 濃度は投与後 22 日から 30 日にかけて徐々にベースラインレベルまで回復した。LDL-C 減少の最大値が認められたのは、evolocumab の血清中薬物濃度のピークより後であった。このことは、evolocumab の LDL-C に対する作用が間接的な薬理作用に基づくことを示唆している。血清中 HDL-C 及び総コレステロールについても、血清 non-HDL-C と同様の結果が得られた。本検討では血清中 HDL-C の低下が示されたが、ヒトと異なり、ハムスターでは HDL-C が LDLR のリガンドであることに留意する必要がある（Goulinet and Chapman, 1993）。

ハムスターの肝臓ホモジネートを各群ごとにまとめ、抗 LDLR 抗体を用いた Western hybridization を行った。evolocumab を投与しないハムスターを t = 0 群（対照群）とした。投与 3 日目の肝臓ホモジネートの総 LDLR 蛋白濃度は、対照群より evolocumab 投与群のほうが高かった（最大 2.9 倍以上）（図 2.6.2-4）。LDLR 蛋白濃度は、3 mg/kg 投与群では投与 10 日目までに、10 mg/kg 投与群では投与 10 日以降に、ベースライン（対照）の水準に戻り（図 2.6.2-4）、これは血清中脂質濃度の正常化とほぼ同様であった（図 2.6.2-2）。各レーンは 4～6 匹のサンプルをまとめたものを用いたため、動物間における LDLR に対する作用のばらつきは不明である。3 mg/kg 投与群の 3 日目の LDLR 蛋白濃度上昇が、10 mg/kg 投与群の 3 日目の上昇より大きかったことや、10 mg/kg 投与群の 18 日目に LDLR 蛋白濃度が低下していたことは、この種の測定法の通常のばらつきの範囲内と考えられる。

evolocumab 曝露量は用量依存的に増加し、最終消失相における半減期は、用量範囲を通じて同様であった（3、10、30 mg/kg でそれぞれ 110、120、110 時間）。

この結果から、ハムスターにおいて、evolocumab は単回 SC 投与により肝臓 LDLR 蛋白濃度を上昇させ、血清中 non-HDL-C を低下させることが示された。効果持続時間は、evolocumab の用量が高いほど長かった。



evolocumab（3、10 又は 30 mg/kg）又は対照として抗 KLH 抗体（30 mg/kg）をハムスターに単回 SC 投与し、1、3、10、14、18、22、26 及び 30 日後に屠殺した。結果は各群各時点 4-6 例の平均値 ± 標準誤差を表す。* 、** 及び *** は、各時点における各 evolocumab 投与群の抗 KLH 抗体投与群に対する有意差を示す（それぞれ $P < 0.05$、0.01 及び 0.001；一元配置分散分析で有意性［$P<0.05$］を確認後，Dunnett 検定を実施）。出典：報告書 R20080179

図 2.6.2-2　ハムスターにおける evolocumab の血清 non-HDL-C に対する作用

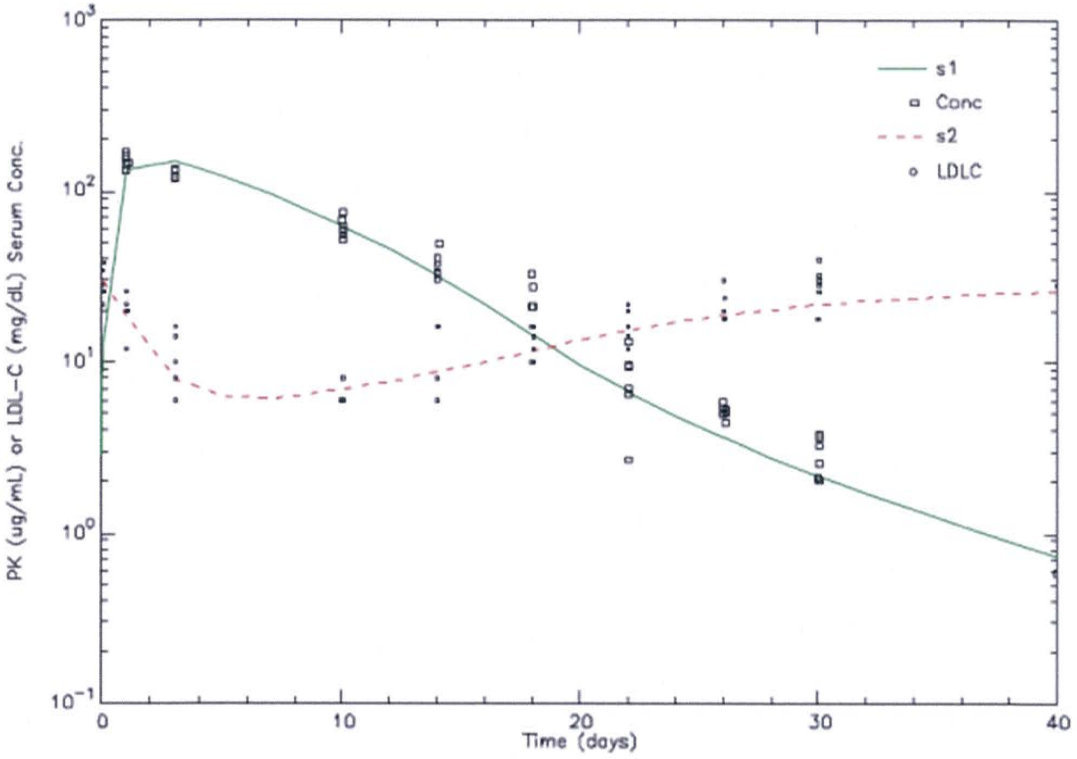


図 2.6.2-2 の脚注に記載した試験における血清中薬物濃度の実測値（中抜き四角-Conc）をモデルからシミュレーションした推移（緑の実線-s1）と共にプロットした。同様に、血清中 LDL-C 濃度の実測値（中抜き丸-LDLC）をモデルからシミュレーションした推移（赤点線-s2）と共にプロットした。出典：報告書 R20080179

図 2.6.2-3　evolocumab 30 mg/kg を皮下投与後のハムスターにおける血清中薬物濃度及び LDL-C 濃度の実測値（中抜き記号）及びモデル予測値（s1 及び s2 曲線）の推移

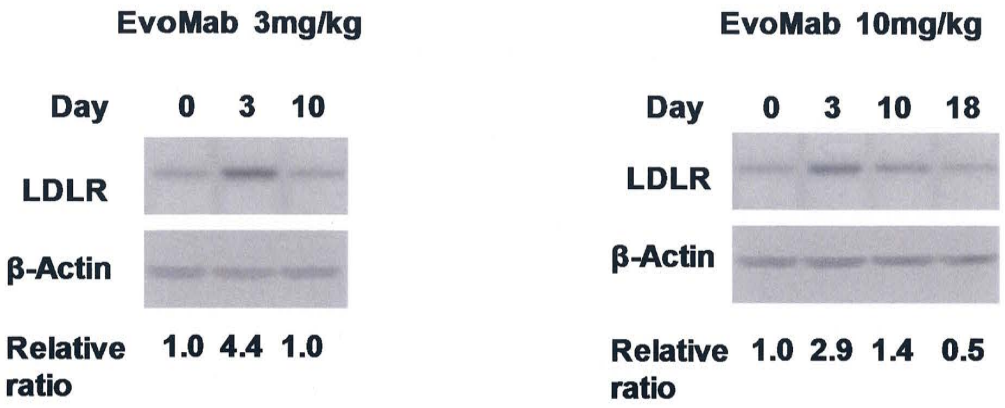


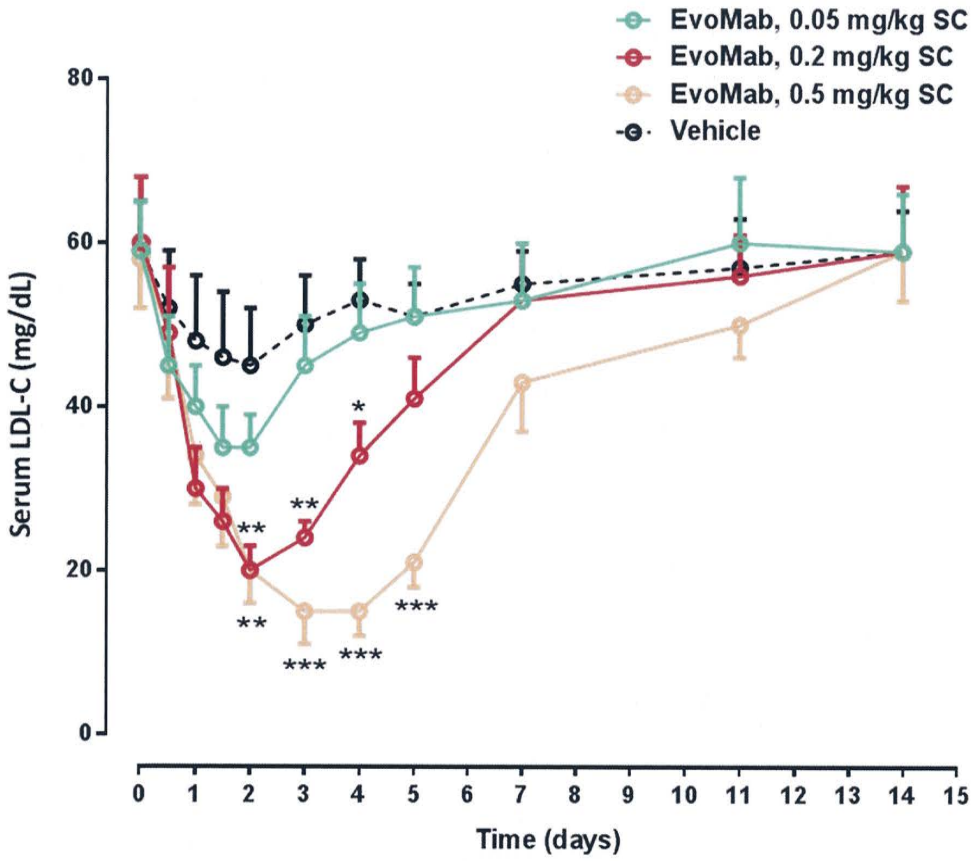
図 2.6.2-2 の脚注に記載した試験における各群 4-6 例のハムスターから，肝臓サンプルを採取してホモジネートし、各群ごとにまとめて Western hybridization を行った。シグナルはデンシトメーターで定量化してβ-アクチンに対する LDLR の割合を算出し、evolocumab を投与しないハムスターを Day 0 としてその比を 1.0 に設定したときの、evolocumab 3 及び 10 mg/kg 投与群の各時点の相対比を示した。出典：報告書 R20080179

図 2.6.2-4　ハムスターにおける evolocumab の肝臓 LDLR 蛋白濃度に対する作用

2.6.2.2.2.2　カニクイザルにおける evolocumab の評価（報告書 R20090025）

実験未使用の雄カニクイザルを用いた evolocumab の薬物動態／薬力学（PK/PD）試験では、evolocumab（3、10、30 mg/kg）の単回 SC 投与により平均血清中 LDL-C 濃度が有意に低下した。全投与群において投与開始から 7 日～14 日以内におよそ 80%の低下であった（111322 試験［2.6.4.1.1.1.1 項］）。その後、LDL-C はベースラインの水準に回復し、回復に要した時間（効果持続時間）は用量に関連していた。LDL-C 低下の最大値はすべての用量で同等であったため、その後のカニクイザルの試験では、低用量（0.05、0.2、0.5 mg/kg）で単回投与を行った。対照群には溶媒を投与した。投与の 0.5、1、1.5、2、3、4、5、7、11、14 日後に採血を行い（0.5 及び 1.5 日後以外は一晩絶食後）、臨床分析装置で血清中脂質を測定した。evolocumab 投与群のサルでは、血清中 LDL-C は対照群と比較して顕著で統計学的に有意な低下がみられ、この低下は用量依存的であった（図 2.6.2-5）。最高用量の evolocumab 0.5 mg/kg を投与したとき、LDL-C 低下率は 4 日後に 72%と最大になり、 7 日後までにベースラインもしくは対照の水準にまで回復した。LDL-C の最大低下は、より高用量で evolocumab を投与した以前の試験の水準と同程度であった。evolocumab を 0.2 mg/kg の用量で投与したとき、LDL-C 低下率は 2 日後に 56%と最大になり、5 日後までにベースラインもしくは対照の水準にまで回復した。最低用量の evolocumab 0.05 mg/kg を投与したとき、多くの時点で平均血清 LDL-C 濃度は低下したが、溶媒（対照群）との間に統計学的有意差は認められなかった。血清中総コレステロールの結果は、LDL-C の結果と同様であった。すなわち、最高用量の evolocumab 0.5 mg/kg では、3 日後に 29%の総コレステロール最大低下率を示し、0.2 mg/kg では 3 日後に 22%の最大低下率を示した。HDL-C あるいはトリグリセリドに統計学的に有意な変化はみられなかった。

このように、カニクイザルを用いた本試験及び以前の試験結果（111322 試験［2.6.4.1.1.1.1 項］）から、evolocumab を 0.2～30 mg/kg の SC 単回投与は、用量に応じて LDL-C 及び総コレステロールを低下させた。



evolocumab（0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg）又は溶媒をカニクイザルに単回 SC 投与した。結果は各群各時点 5 例の平均値 ± 標準誤差を表す。*、** および *** は、各時点における各 evolocumab 投与群の抗 KLH 抗体投与群に対する有意差を示す（それぞれ $P < 0.05$、0.01 および 0.001；線形混合効果モデルで有意性［$P<0.05$］を確認後、対比較検定を実施）。出典：報告書 R20090025

図 2.6.2-5　カニクイザルにおける evolocumab の血清 LDL-C に対する作用

2.6.2.2.3　その他の効力を裏付ける試験

その他の *in vivo* 試験として、1A12、23B5、8A3、9C9、並びに AMG 492 といった前臨床段階の抗 PCSK9 抗体の PK/PD を検討する際の比較対象として、evolocumab が用いられた試験がある（R20090001、R20090266、R20100042、R20110022）。これらいずれの試験においても evolocumab の成績は、試験間並びに過去の試験と比較してほぼ同様であり、薬理学又は安全性に関して新たな情報は得られていない。試験デザイン及び得られた知見の要約は、薬理試験の概要表（2.6.3 項）に示す。

2.6.2.3　副次的薬理試験

PCSK9 は主に肝臓に発現して、肝臓の LDLR を調節しているが（Seidah et al, 2003）、小腸、腎臓、膵臓、脳等ほかの器官でも検出されている（Seidah et al, 2003、Poirier et al, 2006、Langhi et al, 2009）。全身循環血にも遊離 PCSK9 は認められるが、ヒトでの血漿中濃度は、代謝や食事、遺伝な

ど、複数の要因次第で大きく異なる（Lakoski et al, 2009）。例えば機能喪失（LOF）突然変異を持つ個人では検出限界以下であり（Zhao et al, 2006）、血中脂質正常者や脂質低下療法を受けていない高コレステロール血症患者ではおよそ 300 ng/mL（Koren et al, 2012; Koren et al, 2014; Blom et al, 2014）、また家族性高コレステロール血症患者では 600 ng/mL を超える（Raal et al, 2012; Stein et al, 2013）。

PCSK9 の LOF 突然変異では、血清中 LDL-C が低値を示すとともに CVD リスクも低く（Cohen et al, 2006）、また循環血液中に PCSK9 が検出されなくても有害な事象は生じていない（Zhao et al, 2006、Hooper et al, 2007、Cariou et al, 2009）。しかし、報告されている PCSK9 蛋白の分布からすると、PCSK9 には肝臓を介した LDL-C の調節以外の役割があるかもしれない。以下の項では、理論的に想定される PCSK9 の役割の生理学的な重要性や、肝臓以外の部位で evolocumab が PCSK9 を阻害した場合に想定される影響、さらに血中 LDL-C 低下が CVD リスク低減以外に与え得る影響について論じる。

2.6.2.3.1　evolomucab の脳及び認知機能に対する潜在的影響

ヒトの脳はコレステロールを多く必要とし（Dietschy and Turley, 2001、Dietschy and Turley, 2004）、脳内コレステロール恒常性の調節異常は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、ニーマン - ピック病 C 型、スミス - レムリ - オピッツ症候群などの慢性神経変性疾患につながるとされている（Goedeke and Fernandez-Hernando, 2014）。従って理論上、脳内のコレステロール恒常性を乱す脂質低下薬は、神経機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。最近では、スタチン薬の使用に伴う認知機能障害（記憶喪失など）が報告されている（Food and Drug Administration［FDA］, 2012）。

しかし以下のいくつかの理由により、evolocumab の臨床使用は認知機能に対して影響しないと考えられる。それらは、evolocumab は脳に十分に到達しないこと、PCSK9 の LOF 突然変異や evolocumab の長期間投与（1 年を超える）は、ヒトにおける認知機能障害と関連しないこと、動物試験において evolocumab が生涯投与試験でも神経行動学的に影響せず、脳病理組織学的にも変化を及ぼさなかったこと、evolocumab の作用機序がスタチンと異なっていること、さらに脳における PCSK9 機能とコレステロール恒常性についての我々の知見などが挙げられる。以下に、これらについてより詳細に論じる。

2.6.2.3.1.1　中枢神経系における PCSK9、LDLR 及び脂質の生物学；現在の理解

コレステロールは脳の構成物質として重要であり、細胞膜及びニューロンを取り囲むミエリン鞘の主要成分である（Dietschy and Turley, 2004、Saher and Simons, 2010）。脳には血液脳関門（BBB）があるため、他の肝外臓器の様に循環血からリポ蛋白を介してコレステロールが供給されない。このため脳のコレステロールは、脳内での合成にのみ由来する（Pitas et al, 1987、Dietschy and Turley, 2004、Zlokovic et al, 2008）。脳中のコレステロール濃度は、コレステロールの生合成と脳からのステロール代謝物 24S-ヒドロキシコレステロールとしての排泄を組み合わせることによって、（循環血液中の濃度とは無関係に）一定に保たれている（Dietschy and Turley, 2004）。また，ヒトの脳に

おけるコレステロール代謝回転速度は極めて遅い（他の組織の約 1/20）（Dietschy and Turley, 2004）。これらの知見は、脳のコレステロール恒常性経路は独自のもので、身体のほかの組織から独立しており、evolocumab による血清中コレステロール低下作用の影響を受けないことを示唆している。

中枢神経系の発生における PCSK9 の役割が、マウス胚細胞を用いた *in vitro* 試験によって示唆されている（Seidah et al, 2003）。この試験では、PCSK9 を遺伝子導入して過剰発現させると神経前駆細胞の分化が促進することが明らかとなった。*in vivo* では、ゼブラフィッシュで PCSK9 mRNA をノックダウンすると、中枢神経系（CNS）の発達障害による出生前死亡が認められた（Poirier et al, 2006）。しかし、より高次の脊椎動物では、複数の研究室から得られた PCSK9 ノックアウト（KO）マウス（Rashid et al, 2005、Chen et al, 2010）、あるいは子宮内で薬理学的活性量の evolocumab に曝露したカニクイザル新生児（2.6.6.6.2 項）の知見、いずれにおいても、形態学的あるいは機能的な CNS の発達障害は認められていない。

発生後の脳をより反映した試験系では、RNAi を介した PCSK9 のノックダウンが、マウス小脳顆粒神経細胞のアポトーシスを減少させることが *in vitro* 試験によって明らかになっている（Kysenius et al, 2012）。一方、PCSK9 の過剰発現は、培養ラットニューロンでアポトーシスを誘発した（Bingham et al, 2006）。これらの *in vitro* データから、脳の PCSK9 はアポトーシスに関与している可能性があり、PCSK9 濃度の低下は細胞の生存を促進するかもしれない。しかしこれらの人為的な操作を加えた *in vitro* 系は、以下のことから *in vivo* での作用を反映していない可能性もある。

成熟ラットでは、脳組織に PCSK9 の mRNA が発現している（Seidah et al, 2003）。また、ヒト脳脊髄液（CSF）でも PCSK9 蛋白が検出されているが、ヒト CSF における PCSK9 濃度は血清濃度の約 1/60 であり、1 日を通じて安定していた（Chen et al, 2014）。これは、血清中 PCSK9 では概日周期／食後の変動がみられるのと対照的である（Persson et al, 2010）。循環血液中の PCSK9 は BBB を通過しないことが明らかにされている（Rousselet et al, 2011）。これらの知見から、脳中の PCSK9 蛋白は局所合成に由来し、循環血液中の濃度とは無関係であると考えられる。

成熟した脳では、LDLR も発現している（Herz and Bock, 2002）。脳における LDLR の通常の機能の特徴は十分に明らかにされていないが、CNS 内の細胞間のコレステロール輸送に関与し、軸索成長を支え、また 24S-ヒドロキシコレステロールの排泄を促すと仮定されている（Dietschy and Turley, 2004）。脳内では、LDLR はアポリポ蛋白 E（ApoE）と結合し、それを調節することも明らかになっている（Herz, 2009、Kim et al, 2009）。ApoE の配列変異は、アルツハイマー病（AD）の良く知られたリスク因子である（Strittmatter et al, 1993、Rhinn et al, 2013、Yu et al, 2014）。ApoE の配列変異が、AD 患者にみられる老人斑の主要成分であるアミロイドβペプチド（Aβ）の分解及び除去に影響するからである（Tanzi et al, 2005、Haass et al, 2007）。マウスの脳では、LDLR の過剰発現により ApoE 濃度が顕著に低下し（最大 90%）、顕著な Aβ凝集の減少及び Aβクリアランスの増加が認められた（Kim et al, 2009）。これらのデータは、マウスモデルの脳における LDLR の増加が、神経変性のリスクを低下させることを示している。

Liu らは、PCSK9 KO マウスの脳では LDLR 濃度が上昇していないことから、肝臓とは異なり、脳では PCSK9 は LDLR を調節していない可能性を示唆している（Liu et al, 2010）。脳において PCSK9 による LDLR 調節機能がないことのメカニズムは十分には理解されていない。しかしながら

近年の *in vitro* 試験では、PCSK9 抵抗性線維芽細胞においては PCSK9 が細胞内に移動後に LDLR から解離して大半が PCSK9 単体でリソソームに進んで分解され、再利用されるのは少量だけであることが明らかになっており（Nguyen et al, 2014）、脳においてもこうしたメカニズムが関係しているかもしれない。

Liu らは、LDLR に対する作用の欠如に加えて、彼らの PCSK9 KO マウス系統の脳ホモジネートではβ部位アミロイド前駆体蛋白（APP）切断酵素 1（BACE1）の発現あるいは Aβの沈着に変化がなかったことを報告した（Liu et al, 2010）。これらのデータは、BACE1 及び Aβの脳濃度が上昇するとした、別の系統の PCSK9 KO マウスにおける以前の報告と対照的である（Jonas et al, 2008）。この 2008 年の報告では、脳 LDLR 濃度は記載されていない。BACE1 の CSF 濃度は AD リスクの予測因子とされているが（Vassar et al, 2004、Zhong et al, 2007）、ヒトの CSF では PCSK9 と BACE1 の濃度間に相関関係はみられないことから（Chen et al, 2014）、Liu らの結果の方が、ヒトから得られているデータと、より一致していると考えられる。

これらの結果は，PCSK9 LOF 一塩基変異多型（SNP）rs11591147 を持つ、約 6000 名の高齢者（年齢 70 歳以上 82 歳以下）を対象とした近年の試験で、血清中コレステロールは低下していたが、認知能力に対する影響はなかった（Postmus et al, 2013）ことと一致している。同様に、AD 症例 1270 名を含む認知症患者 1567 名を対象に高密度連鎖平衡マッピングにより脂質代謝に関与する 25 遺伝子を解析した報告では、認知症と ApoE（既知の AD リスク因子）関連遺伝子マーカーとの関連性は予想どおりみられたが、PCSK9 の配列変異との関連性はなかった（Reynolds et al, 2010）。

結論として、PCSK9 はヒトの脳に極めて低濃度で存在し（血清濃度のおよそ 1/60）、局所的に合成され（全身循環に由来しない）、循環血液中の PCSK9 とは無関係に調節される。CNS 中に認められた PCSK9 の濃度は、認知機能障害の既知のリスク因子と相関していない。また、脳における LDLR の増加に伴って AD のリスク因子の濃度が低下しているが、脳では LDLR は PCSK9 に反応しないように思われる。脳における PCSK9 の機能的役割は明確になっていないが、PCSK9 機能低下と関連した SNP を持つ高齢者に認知機能障害は認められていない。そのため、脳の PCSK9 阻害は、脳の機能あるいは病態生理に影響しないと予想される。また、以下の 2.6.2.3.1.3 項に述べるように、evolocumab は薬理学的に妥当性がある濃度で脳に到達する可能性は低いと考えられる。

2.6.2.3.1.2　スタチン関連性認知機能障害

FDA は、2012 年に、スタチンの使用に伴う記憶喪失、物忘れ、健忘、記憶障害、錯乱等の、まれで重篤ではない可逆性の認知機能障害の報告に言及した、スタチンに関する薬物安全性通知を発行した（FDA, 2012）。FDA はこの通知を、FDA の有害事象報告システム（AERS）のデータベース、既報の医学文献（症例報告及び観察研究：Orsi et al, 2001、Wagstaff et al, 2003、Zamrini et al, 2004、Zandi et al, 2005、Zhou et al, 2007、Evans et al, 2009、Parker et al, 2010、Benito-León et al, 2010、Beydoun et al, 2011、Bettermann et al, 2012）、並びに無作為化臨床試験（Muldoon et al, 2000、Muldoon et al, 2004、Trompet et al, 2010、Feldman et al, 2010）の検討結果に基づいて発行したと述べている。

近年の疫学的分析では、スタチンが認知機能に及ぼす有害な作用はないことが示唆されているが、明確な結論に達するには、より大規模で、より優れたデザインに基づいた試験が必要であると考え

られている（Jukema et al, 2012、Richardson et al, 2013、Swiger et al, 2013、Rojas-Fernandez et al, 2014）。

スタチンに関連した認知機能障害について一般的に提唱されるメカニズムは、スタチンが脳のコレステロール合成を阻害し、神経髄鞘形成を妨げ、神経伝導欠損及び神経機能障害に至るというものである（Golomb et al, 2004、Klopfleisch et al, 2008、Miron et al, 2009、Saher and Simons, 2010、McGuinness et al, 2013）。

こうしたメカニズムや、evolocumab 等モノクローナル抗体 PCSK9 阻害薬がスタチンとは物理化学的特性が異なること、並びに CNS における PCSK9、LDLR、脂質生物学に関する知見に基づくと、スタチンによる神経認知リスクが evolocumab に当てはまる可能性は低いと考えられる。この結論を裏付ける科学的根拠を以下に述べる。

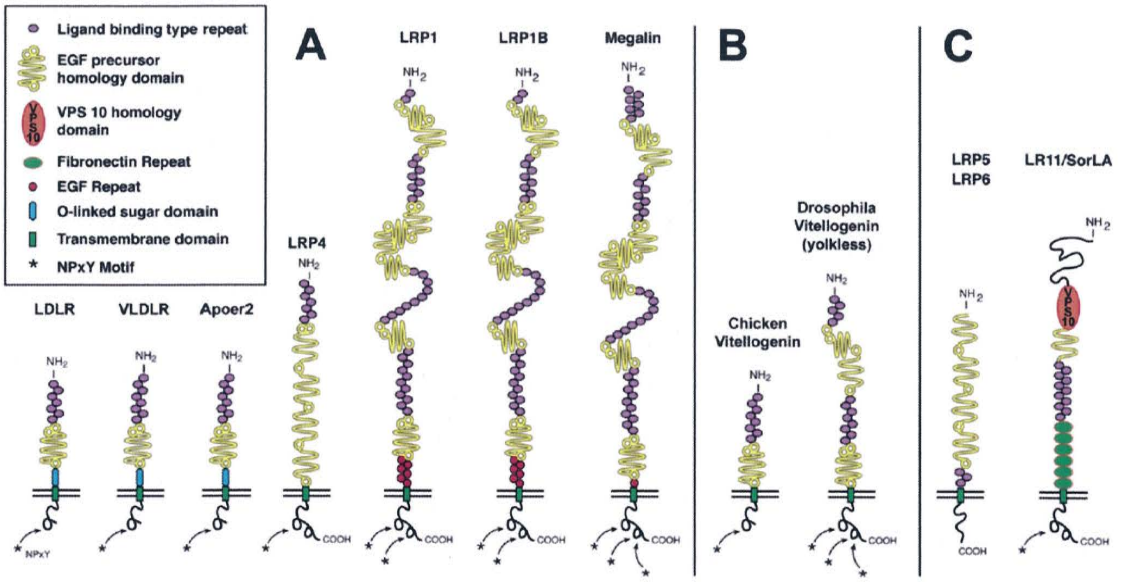
2.6.2.3.1.3　スタチンによる認知機能障害と evolocumab の関連性

2.6.2.3.1.1 項に述べたように、脳のコレステロール恒常性は循環血中コレステロール濃度と関係せず、そのため、evolocumab の血清中コレステロール低下作用には影響を受けないと考えられる。また、循環血液中の PCSK9 は BBB を通過しない（Rousselet et al, 2011）。したがって、evolocumab が CNS に対して影響するのは、脳内において evolocumab が直接作用する場合だけだと考えられる。他の抗体薬と同様、evolocumab の CNS への分布は非常に限定されると推察される（Poduslo et al, 1994、Triguero et al, 1989、Jones and Shusta, 2009、Frank et al, 2011）。循環血液中の抗体の血液濃度に対する脳濃度の割合は、定常状態で 0.1%～0.2%と推定されている（Yu and Watts, 2013）。そのため、患者における evolocumab の既知の循環血液中濃度（2.5 項）に基づくと、evolocumab は脳では薬理学的に意味のある濃度に達しないと予想される。最後に、2.6.2.3.1.1 項に記載したとおり、脳における PCSK9 の局所阻害は、脳の機能あるいは病態生理に影響しないと予想される。

以上の知見は、evolocumab が、CNS 内の PCSK9 に対する局所的な直接作用によっても、またコレステロールや PCSK9 の循環血液中濃度の低下を介した間接的作用によっても、脳中コレステロール濃度に影響しないことを示唆している。この結論は、これまでにどの臨床試験でも evolocumab に関連した神経認知作用が認められていないこと（2.7.4 項）、並びに動物試験において、evolocumab の生涯投与によっても神経行動的変化あるいは脳の病理組織変化が認められていないこと（2.6.2 項及び 2.6.6 項）と一致している。

2.6.2.3.2　PCSK9 が他の LDLR ファミリータンパク質に作用する可能性

LDLR は、超低比重リポ蛋白受容体（VLDLR）、ApoE 受容体 2（ApoER2）、並びに LDLR 関連受容体（LRP's）を含むタンパク質ファミリーのメンバーである。細胞表面受容体の LDLR ファミリーは、リガンド結合リピート、上皮成長因子（EGF）様ドメイン、及び短い細胞質尾部といった複数の構造的特徴を共有している（図 2.6.2-6）。



LDLR ファミリータンパク質（Dieckmann, 2010）。 A). 主要な哺乳類 LDLR ファミリータンパク質、B). 非哺乳類タンパク質、C). 主要なタンパク質と構造的特徴を共有するサブグループ

図 2.6.2-6　LDL 受容体ファミリータンパク質

PCSK9 は主に EGFa ドメインを介して LDLR と結合する（Zhang et al, 2007、Kwon et al, 2008）。ファミリータンパク質間における EGFa ドメインのアミノ酸類似率は 20%～60%である。PCSK9 の LDLR への結合において、LDLR の EGFa ドメインのアミノ酸であるアスパラギン（Asn）295、グルタミン酸（Glu）296、アスパラギン酸（Asp）310、チロシン（Tyr）315、ロイシン（Leu）318 が重要な役割を果たしている（Gu et al, 2013）。Asn、Glu、Asp、Tyr はカルシウム結合及びドメインの折り畳みに関与しており、LDLR、VLDLR、ApoER2、LRP1 に保存されているが、Leu は LDLR のみに存在する（図 2.6.2-7）。

```
hLDLR   293  GTNECLD-NNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCE
VLDLR   329  HINECLV-NNGGCSHICKDLVIGYECDCAAGFELIDRKTCG
ApoER2  300  GLNECLH-NNGGCSHICTDLKIGFECTCPAGFQLLDQKTCG
LRP1    2915 HINECLSRKLSGCSQDCEDLKIGFKCRCRPGFRLKDDGRTC
LRP4    681  GKNRCGD-NNGGCTHLCLPSGQNYTCACPTGFRKISSHACA
LRP6    588  GSNPCAE-ENGGCSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKTC
```

LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント（Gu, 2013）。太字は PCSK9 の結合に重要な役割を果たす主なアミノ酸を示す。

図 2.6.2-7　LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント

VLDLR の Asp を Leu で置換し、LDLR の EGFa を模倣すると、変異型 VLDLR と PCSK9 は結合する。このことは、PCSK9 の LDLR ファミリータンパク質との相互作用において、Leu が重要であること及び LDLR の EGFa に高い選択性があることを強く示している（Zhang et al, 2007）。VLDLR 及

びApoER2は、LDLRと同程度の大きさであり、構造ドメインは類似している（Blacklow, 2007）。LRP1及びLRP2（メガリン）等の、より大きなファミリータンパク質は、複数の基本構造ドメインの繰り返しから成る。ApoEは主要なファミリータンパク質すべてに結合するリガンドであるが、LDLRファミリータンパク質は、ApoEだけではなく多様な高分子と細胞表面で結合し、エンドサイトーシスと呼ばれる、細胞膜陥入で細胞内に取り込むプロセスによって、それらを細胞内に輸送する（Brown et al, 1997）。

LDLRは、リガンドであるApoE及びApoBを含む脂質輸送リポ蛋白だけでなく、PCSK9と結合する（Blacklow, 2007）。受容体ファミリー間の構造的特徴の類似性を考慮すると、理論的には、PCSK9がLDLR発現量を制御するのと同様の方法で他の受容体発現量を制御し、それらのリガンド量を調節している可能性がある。以下の項では、このPCSK9相互作用の可能性を考察し、PCSK9のVLDLR、ApoER2、ほかのLDLRファミリータンパク質との相互作用が、evolocumabを患者に投与する際の安全性に影響する懸念はないとの結論を述べる。

2.6.2.3.2.1　PCSK9とLDLRファミリー受容体との*in vitro*における相互作用

PCSK9とLDLR、LRP1、VLDLR、ApoER2（LRP8）、並びにソルチリン（LR11/SorLA）との*in vitro*結合又は相互作用が検討されている。

PCSK9及びLRP1

PCSK9を過剰発現させたHepG2細胞では、内因性LDLRは減少したが、LRP1（LDLRと40%の同一性を示す）は減少しなかったことから（Westernブロット解析により判定）、PCSK9とLRP1の間に相互作用はないと考えられた（Benjannet et al, 2004）。対照的に、Canuelらは、PCSK9の過剰発現により多くの細胞株でLRP1発現が減少することを見出したが（Canuel et al, 2013）、この試験では上述の試験よりもPCSK9の発現量が多く、データの生理学的な意味は不明である。

PCSK9及びVLDLR、ApoER2

PCSK9とVLDLR及びApoER2との相互作用が、無細胞系のタンパク質結合試験並びに発現細胞株で検討されている。結合試験には、精製組換えタンパク質が用いられている。

無細胞系の結合アッセイでは、精製PCSK9とVLDL受容体及びApoER2との直接相互作用が検討された（Shan et al, 2008）。その結果、PCSK9のVLDLR及びApoER2に対する親和性は、LDLRに対する親和性よりおよそ10倍及び100倍弱いことが示された（Shan et al, 2008）。この結果とは異なり、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用した結合実験では、組換えPCSK9は、同程度の親和性でLDLR（K_D 386 nmol/L）、VLDLR（K_D 379 nmol/L）、並びにApoER2（K_D 516 nmol/L）と結合することが明らかになった（Liu et al, 2010）。これらの違いには、組換えタンパク質及び異なる非生理条件での測定が関連していると考えられた。

精製タンパク質ではなく、細胞表面にLDLR及びVLDLRを発現させたトランスフェクト細胞においては、PCSK9はVLDLRと結合しなかった（Zhang et al, 2007、Gu et al, 2013）。Poirierらも細胞にVLDLR及びApoER2をトランスフェクトして発現させた。外因性PCSK9と培養したとき、VLDLR及びApoER2蛋白濃度が低下したことから、VLDLR及びApoER2受容体の発現の制御にPCSK9が関与していることが示唆された（Poirier et al, 2008）。ふたつの研究から得られた結果に差が生じた理由は明らかではない。

別の一連の試験では、PCSK9 を RNAi でノックダウンすることにより、Western ブロッティングで測定した培養神経細胞中の ApoER2 蛋白発現量が増加した（Kysenius et al, 2012）。

PCSK9 及びソルチリン

近年、SPR による精製タンパク質の親和性測定及び細胞溶解物の免疫沈降により、PCSK9 とソルチリンが相互作用することが報告されている（Gustafsen et al, 2014）。ソルチリン欠損マウスでは血漿中 PCSK9 濃度が低下し、ソルチリン過剰発現マウスでは上昇していた（Gustafsen et al, 2014）。ほかの細胞表面受容体とは対照的に、ソルチリンは細胞内でのみ PCSK9 と相互作用し、細胞からの PCSK9 分泌を促すと考えられる。evolocumab と分泌された PCSK9 は細胞外で相互作用するため、evolocumab がそのプロセスに影響する可能性は低い。

これらの点を総合的にみると、上記の試験から PCSK9 が LDLR 以外の LDLR ファミリータンパク質と *in vitro* においては相互作用する可能性が確認された。

2.6.2.3.2.2　PCSK9 と LDLR ファミリー受容体との *in vivo* における相互作用

PCSK9 KO マウスを用い、PCSK9 と LDLR ファミリータンパク質（LRP1、VLDLR、並びに ApoER2）との *in vivo* 結合又は相互作用が検討されている。

PCSK9 と VLDLR、及び LRP1

Rashid らが作成した PCSK9 KO マウスでは、全肝臓溶解物を Western ブロットにより測定したところ、VLDLR あるいは LRP1 蛋白濃度に変化はみられなかったが、LDLR 蛋白濃度には明らかに上昇が認められた（Rashid et al, 2005）。野生型マウスと PCSK9 KO マウスの間で体重に有意差はなかったが、脂肪蓄積の差は言及されていない。Roubtsova らが作製した別の系統の PCSK9 KO マウスでは、生後 6 カ月のマウスの生殖腺周囲脂肪における細胞表面 VLDLR 蛋白量は、野生型の系統と比較して最大で 40 倍高かった。野生型マウスと比較して内臓脂肪蓄積は約 80%多かったが、体重には差がなかった（Roubtsova et al, 2011）。彼らは、この KO マウスでは PCSK9 が全く存在しないことにより脂肪組織の VLDLR 発現量の増加を引き起こしトリグリセリド沈着を増加させ、その結果、組織量の増加が引き起こされたと考察している。

これら 2 つの報告は異なっているが、Rashid らにより報告された *in vivo* の成績は、evolocumab の非臨床データと一致している（Rashid et al, 2005）。カニクイザル及びハムスターを用いた毒性及び薬理試験において、evolocumab による PCSK9 阻害の影響が広範に検討されており、両動物種に薬理作用を示す用量を超える用量を投与したとき、PCSK9 の阻害と LDLR の増加、及び血清中 LDL-C の低下がみられたが、身体の脂肪蓄積あるいは体重に対する作用等、PCSK9 とほかの LDLR ファミリータンパク質との相互作用に関連すると考えられる作用は認められなかった。Roubtsova らにより報告されたデータが異なっている理由は不明である（Roubtsova et al, 2011）。

evolocumab はいずれの臨床試験でも PCSK9 阻害と体重の間に逆相関が報告されていないことから、ヒトでは VLDLR 発現に対する PCSK9 阻害の影響がないことが示唆される（2.7.4 項）。しかし、多くの臨床試験において、evolocumab 投与被験者ではプラセボ投与被験者と比較して血漿中 VLDL コレステロール及び血漿中トリグリセリド濃度が約 20%～30%低下している（2.7.3 項）。PCSK9 阻害により VLDL が低下するメカニズムは完全には解明されていないが、PCSK9 阻害によりアップレギ

ュレートされる肝臓 LDLR が VLDL と結合できることを考慮すると、血漿中 VLDL の低下は肝臓 LDLR を介した VLDL の再取込みに起因する可能性が極めて高いと考えられる。

PCSK9 及び ApoER2

ApoER2 は、主に脳に発現する（Reddy et al, 2011）。PCSK9 KO 及び PCSK9 過剰発現トランスジェニックマウスを用い、*in vivo* で脳 ApoER2 蛋白発現制御における PCSK9 の役割が検討されている（Liu et al, 2010）。どちらのモデルでも、海馬及び皮質溶解物の Western ブロットにより測定した脳 ApoER2 蛋白濃度は、野生型と同一であった。また、evolocumab は、薬理学的に意味のある濃度で脳に分布する可能性は低い（2.6.2.3.1.1 項）。

以上より、結論として、*in vivo* で PCSK9 と LRP1、VLDLR、あるいは ApoER2 との間に機能的に意味のある相互作用があることを示す証拠は得られていない。

PCSK9 の阻害は、ほかの LDLR ファミリータンパク質に有害な作用をもたらすことはないと予想され、そのことは evolocumab について得られている広範な臨床及び非臨床データと一致している。

2.6.2.3.3 C 型肝炎感染性において予想される PCSK9 阻害の影響

C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染は複雑な多段階のプロセスであり、ウイルス側と細胞側双方の複数の因子が関係し、それらによってウイルスの肝細胞への取り込みやその後の HCV 複製が誘発される（Burlone and Budkowska, 2009）。CD81 やスカベンジャー受容体 SR-BI、密着結合分子のクラウディン 1 及びオクルジンは、HCV の肝細胞侵入を媒介する主要な受容体である（Pileri et al, 1998、Scarselli et al, 2002、Evans et al, 2007、Liu et al, 2010）。LDLR も HCV 感染性を修飾すると考えられているが、その正確な役割は明らかになっていない（Molina et al, 2007、Burlone and Budkowska, 2009）。一部の研究者は、LDLR が HCV の細胞侵入に必要であることを示唆しているが（Agnello et al, 1999）、より最近の研究ではこの説に異議が唱えられており、むしろ感染後に HCV が LDLR 表面発現をアップレギュレートして細胞内脂質環境を修飾することにより HCV の増殖が促進されていることが提起されている（Albecka et al, 2012、Syed et al, 2014）。LDLR の関与はさらに複雑であり、スタチンは LDLR を増加させる一方、HCV 複製を阻害する作用もあり、実際、HCV 治療薬としての可能性が研究されている。ただし、スタチンの抗ウイルス特性は、イソプレノイド枯渇に基づく可能性が高い（Vere et al, 2012）。LDLR の正確な役割は明らかになっていないが、理論的には、PCSK9 阻害を通じた LDLR 発現の増加により HCV の易感染性が高まる可能性がある。この可能性に関して、*in vitro* 及び *in vivo* での研究がある（Labonté et al, 2009、Mazumdar et al, 2011、Ramanathan et al, 2013）。

Labonté らは、*in vitro* で非分泌性過剰発現細胞膜結合型の PCSK9 を使用して、PCSK9 が LDLR とは無関係に、主要な HCV 細胞侵入因子である CD81 表面発現を減少させ、HCV 感染を抑えることを明らかにした（Labonté et al, 2009）。Mazumdar らは、別の *in vitro* 系では、PCSK9 プラスミド DNA あるいは PCSK9 機能獲得型突然変異（D374Y）のトランスフェクションが、CD81 発現レベルに影響しなかったことを示した（Mazumdar et al, 2011）。また、Labonté らは *in vivo* で、PCSK9 KO マウスで CD81 の肝臓発現が増加したことも明らかにしている（Labonté et al, 2009）。これらの結果に基づき、彼らは、ヒトでは血漿中 PCSK9 濃度及び活性の両方またはどちらかが低下すると HCV 感染リスクが上昇する可能性があると仮定した。しかしその後得られたデータでは、この仮定

に異議が唱えられている（Ramanathan et al, 2013）。Ramanathan らは、十分に確立された *in vitro* HCV 侵入モデル（Bartosch and Cosset, 2009）において、生理的な可溶型 PCSK9 を加えても CD81 の発現に変化はみられず、HCV 感染に対する影響がなかったことを明らかにした。同じモデルに PCSK9 を阻害するモノクローナル抗体を投与しても、HCV 感染に対する影響はなかった（Ramanathan et al, 2013）。さらに、Labonté らと異なる系統の PCSK9 KO マウスや抗 PCSK9 モノクローナル抗体を投与したヒト PCSK9 発現高コレステロール血症マウスでも、*in vivo* の肝臓 CD81 発現に変化はみられなかった（Ramanathan et al, 2013）。

結論として、多くの報告が、evolocumab を介した PCSK9 の阻害により HCV 感染リスク（ウイルスの侵入や複製）は上昇しないことを支持しており、また、このことは臨床試験の結果と一致している（2.7.4 項）。

2.6.2.3.4 インスリン抵抗性及び糖尿病リスクに対して予想される PCSK9 阻害の影響

ヒトにおいて PCSK9 の循環血中濃度は、空腹時血清グルコース、インスリン、インスリン抵抗性指数（HOMA-IR、インスリン感受性の指標、Lakoski et al, 2009、Baass et al, 2009）といった複数のグルコース代謝の指数と正の相関関係を示すことが報告されている。こうした所見と一致して、ヒトでは絶食（低インスリン状態）に伴って血漿中 PCSK9 濃度の低下が認められる（Browning et al, 2010）。しかし、Cariou らによる最近の試験では、ヒトにおけるこうした関連性は、PCSK9 濃度とグルコース恒常性との因果関係よりも、むしろ食事の影響が原因で生じている可能性が高いことが示されている（Cariou et al, 2013）。動物モデルでは、インスリンが PCSK9 発現を調節できることが示されているが（Costet et al, 2006、Niesen et al, 2008、Persson et al, 2009）、これはヒトにはあてはまらないようである。Kappelle らは、健常被験者及び 2 型糖尿病患者を対象にした 24 時間インスリン持続投与試験において、血漿中 PCSK9 濃度に変化がないことを示した（Kappelle et al, 2011）。ただし、近年の報告では、特定の集団では急性作用が生じる可能性も示唆されている（Awan et al, 2014）。また、2 型糖尿病患者あるいはグルコース代謝障害患者の平均血漿 PCSK9 濃度は、健常人と差がなかった（Brouwers et al, 2011）。これらの知見は、おおむねヒトでは PCSK9 とグルコース恒常性の間に因果関係がないことを示唆している。

PCSK9 阻害と糖尿病リスクの関係については、2 種類の PCSK9 KO マウス系統で矛盾するデータが得られている（Langhi et al, 2009、Mbikay et al, 2010）。組換え型 PCSK9 は、*in vitro* で培養マウス膵島における LDLR を減少させたが、*in vivo* の PCSK9 KO マウスでは、PCSK9 の欠損により膵島機能は変化せず、グルコース恒常性の乱れを示す表現型は示されなかった（Langhi et al, 2009）。逆に、Mbikay らは異なる遺伝的背景の PCSK9 KO マウスにおいて、グルコース不耐性及びβ細胞アポトーシスを報告した（Mbikay et al, 2010）。また、機能喪失型 PCSK9 突然変異（Y142X 及び／又は C679X）を持つ人々では、そうでない人々と比較して糖尿病の発生率が上昇していないことは重要な知見である（Cohen et al, 2006）。これらのデータを考え合わせると、evolocumab による PCSK9 阻害により糖尿病のリスクは上昇しないことが示唆される。

この結論は、高血清中コレステロール濃度と膵島機能不全及び糖尿病リスク上昇とが関連していることからも支持される（Brunham et al, 2008、Brunham et al, 2010）。糖尿病リスクの上昇は、膵臓β細胞に対する糖脂質毒性、すなわち高濃度の循環血中脂質及びグルコースによる悪影響によるも

のである（Unger et al, 2002）。そのため、血漿中コレステロール濃度を引き下げると糖尿病リスクが低下すると考えられたが、最も幅広く処方されている脂質低下薬であるスタチンは、むしろ糖尿病リスクを高めることが報告されている（Rajpathak et al, 2009、Sattar et al, 2010、Culver et al, 2012）。スタチンによる糖尿病リスク上昇の明確なメカニズム解明はなされていないが、こうした作用は、スタチンによる血清中コレステロール低下ではなく、スタチンを介したHMG CoA還元酵素阻害（イソプレノイド及びユビキノン枯渇）に基づく多元的影響によるものと考えられる（Sampson et al, 2011、Sattar et al, 2012）。これらのデータは、スタチンで報告されている糖尿病誘発作用が、メカニズム的にはPCSK9阻害にはあてはまらないことを示唆している。

この結論は、evolocumabの臨床及び非臨床の安全性試験において、evolocumabによるグルコース恒常性の変化がみられなかったことと一致している。臨床試験では、evolocumab 420 mg4週に1回投与（Q4W）を1年以上継続した被験者を対象として、血中グルコース及び糖化ヘモグロビン（HbA1c）が評価されている（2.7.4項）。非臨床試験では、ハムスター（114976試験）及びカニクイザル（110359試験）に最長で生涯を通じて薬効用量を超えるレベルのevolocumabを投与し、血漿中及び尿中のグルコース濃度、臨床症状、膵臓病理組織所見が検討されている（2.6.6項）。

2.6.2.3.5　スタチンによるミオパチーのメカニズムとPCSK9阻害との関連

スタチンは一般に良好な忍容性を示すが、患者のおよそ10%（本邦の報告ではおおむね1%未満〔折井ら, 2010、Chang et al, 2013、Ooba et al, 2014〕）は筋肉痛、筋痙攣、虚弱、まれに生命を脅かす横紋筋融解症等の筋肉症状（ミオパチー）を訴え、それらの症状により患者の服薬が制限される恐れがある（Baker and Tarnopolsky, 2001、Thompson et al, 2003、Arora et al, 2006、Harper et al, 2007、Abd et al, 2011、Rosenson et al, 2014）。ミオパチーによるスタチン不耐性のためにLDL-Cが十分に管理されていない高リスクの患者がいることは、健康上の重大な問題である（Guyton et al, 2014）。

スタチン療法とミオパチーの関連性について、多くの仮説が提唱されてきた（Taha, 2014）。コレステロールは筋肉細胞の生存能力に重要であるため、当初、スタチンに関連するミオパチーは全身のコレステロール低下によるものと推定されたが（Baker and Tarnopolsky, 2001、Thompson et al, 2003）、この仮説は*in vitro*のスクアレン合成（コレステロール生合成経路におけるコレステロールの直前のステップ）を阻害しても筋毒性が誘発されなかったという所見と一致しなかった（Flint et al, 1997）。スタチン誘発性ミオパチーが全身のコレステロール低下とは無関係であり、むしろ、メバロン酸の下流にあってミトコンドリア機能など骨格筋の恒常性や生存に必要である1種類以上のイソプレノイド中間体が枯渇することによって起きていることを示す証拠が増加している（Dirks et al, 2006、Vaklavas et al; 2009、Mallinson et al, 2012、Thompson and Parker, 2013）。この仮説を実験的に研究した（118361試験）。

2.6.2.3.5.1　ラットにおけるセリバスタチン誘発性ミオパチーと、コレステロール生合性経路におけるコレステロール低下又はイソプレノイド中間体枯渇の役割（118361 試験）

この試験の目的は、スタチン誘発性ミオパチーが、コレステロール生合成経路におけるイソプレノイド中間体によってもたらされるものであり、血清コレステロール濃度の低下によってもたらさ

れるものではないという仮説を検証することであった。これまで汎用されているセリバスタチン誘発性ミオパチーのラットモデルを使用した（Westwood et al, 2005、Westwood et al, 2008、Schaefer et al, 2004）。このラットモデルでは、ヒラメ筋をI型筋繊維（遅筋）型筋肉の代表例とし、長趾伸筋（EDL）、腓腹筋、並びに大腿二頭筋をII型筋繊維（速筋）型筋肉の代表例とした。ラットにメバロン酸（HMG CoA還元酵素のすぐ下流、イソプレノイド中間体の上流の中間体であり、この枯渇がスタチンミオパチーの原因と推定されている）又はコレステロール（イソプレノイド中間体の下流）を加えた標準食を摂餌させた。仮説に基づき、メバロン酸はセリバスタチン媒介性ミオパチーを抑制し、一方、コレステロールはそのような抑制効果を示さないと想定した。

これまでの報告と同様、ラットにセリバスタチンを2週間投与すると、II型筋にはミオパチーが誘発されたが、I型筋には誘発されなかった。上記の筋肉の種類の顕微鏡検査及び筋損傷の高感度バイオマーカー（血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ、脂肪酸結合蛋白3、骨格筋トロポニン1、並びに尿中ミオグロビン）の評価において、セリバスタチン誘発性ミオパチーは、飼料にメバロン酸を添加することにより完全に抑制された。対照的に、セリバスタチン投与ラットの飼料にコレステロールを添加すると、循環血液中のコレステロール濃度は投与前の濃度を上回ったがミオパチーは抑制されず、スタチン媒介性ミオパチーが循環血液中のコレステロール濃度低下に基づくものではないことが確認された。

これらのデータは、スタチン誘発性ミオパチーは、コレステロールの上流及びメバロン酸の下流のコレステロール生合成中間体が関係することを示している。この結果は、ほかの研究者の報告（Dirks et al, 2006、Vaklavas et al, 2009、Mallinson et al, 2012、Thompson and Parker, 2013）と併せ、イソプレノイド中間体の枯渇が筋毒性につながる重要なステップであること（及びコレステロールの低下が原因ではないこと）を示している。こうしたことから、イソプレノイド中間体枯渇と関連していないPCSK9阻害によるコレステロールの低下は、ミオパチーを引き起こさないと予想される。

これらの結果と一致して、スタチンの有無にかかわらず、いずれの臨床試験（2.7.4項）および非臨床安全性試験（2.6.6項）でも、evolocumabの投与に伴う筋毒性は認められていない。非臨床試験では、evolocumabを薬効用量レベルを超える用量でハムスターに最長2年間、カニクイザルに最長6カ月間投与している。筋肉と関連した評価では、臨床症状、臨床生化学検査（血清中AST、CK、並びにアルドラーゼ）、並びに病理組織検査（大腿二頭筋等のスタチン誘発性ミオパチーが生じやすいことが知られているIIB型筋肉を含む）を評価した。結論として、これらのメカニズムについて考慮すべき事項と臨床及び非臨床所見を総合的に検討した結果、evolocumabにはミオパチーの臨床的リスクはないと予想される。

2.6.2.3.6 PCSK9の阻害による血漿リポ蛋白脂質の最終代謝及び肝胆道系及び消化管に対する影響の可能性

evolocumabは、肝細胞表面のLDLR発現量を増加させることによって肝臓による循環血液中からのLDLの取り込みを増加させ、コレステロール等のLDLの脂質成分の肝臓への輸送を増加させる。この機序からは、肝細胞において脂質蓄積や代謝、コレステロール代謝産物の排泄が増加し、細胞内胆汁酸の蓄積や胆汁酸排泄が増加する可能性が考えられる。これらの理論上の可能性を毒性試験及び文献検索において検討した結果、臨床的に考慮すべき懸念は見いだされなかった。

2.6.2.3.6.1　肝臓 LDL-C 輸送の増加に対する肝臓の恒常性反応

PCSK9 の阻害は、肝臓 LDLR の発現量を増加させることにより、肝細胞のコレステロール及びトリグリセリド含有量を増加させる可能性がある。肝臓におけるコレステロール及びトリグリセリドの恒常性は、複数のフィードバック制御メカニズムにより厳密に調節されている。肝細胞へのコレステロール及びトリグリセリド輸送量が増加すると、以下のメカニズムにより調整される。

- 内因性コレステロール生合成の低下（Espenshade and Hughes, 2007）
- 遊離コレステロールの胆汁への直接的な排泄の増加（ABCG5/G8 トランスポーターを媒介）（Wu et al, 2004）
- コレステロールの胆汁酸への変換（CYP7A1 により調節）及び胆汁への排泄（Russell et al, 2003）

PCSK9 KO マウスでは、肝 LDLR 活性の増加に伴ってこれらのメカニズムが働いていることが示されており、肝臓のトリグリセリド、コレステロール及び胆汁酸含有量は、野生型マウスと同等であった（Rashid et al, 2005）。またこれらのことはスタチン投与後でも同様であった（Parker et al, 2013）。

同様に、evolocumab をカニクイザルで最長 6 カ月間、ハムスターで 2 年間投与したとき、あるいはロスバスタチンと併用してカニクイザルに 3 カ月間投与したとき、肝臓の異常は認められなかった（2.6.6 項）。具体的には、肝胆道あるいは腸に毒性を示す病理組織学的所見、肝脂肪変性、胆石形成、あるいは血清中トランスアミナーゼの変化は認められなかった。これらのデータは、肝臓が PCSK9 阻害によるリポ蛋白取り込み増加に対して順応することができ、有害な作用が引き起こされることもないことを示している。

ヘテロ接合性 PCSK9 LOF 突然変異を持つ被験者において、陽子核磁気共鳴分光法により肝臓トリグリセリド含量を測定したところ、突然変異を持たない被験者との有意差はみられなかった（Kotowski et al, 2006）。また、いずれの臨床試験でも evolocumab による肝障害の証拠はなく（2.7.4 項）、コレステロール及びトリグリセリドは evolocumab 投与被験者の肝臓に蓄積しないものと考えられた。

2.6.2.3.6.2　胆汁酸の排泄増加の可能性

肝臓のコレステロールは、遊離コレステロールとして、あるいは胆汁酸への代謝後に、胆汁に排泄される可能性がある。理論的には、LDLR の発現量が増加すると胆汁酸の合成及び排泄が増加するか、遊離コレステロールとして胆管系へ、最終的には消化管への排泄が増加する可能性がある。肝細胞における胆汁酸合成は、毒性を示す可能性がある水準にまで胆汁酸が増加しないように、厳密に制御されている。コレステロールから胆汁酸への変換における律速段階は、コレステロールを 7-α-ヒドロキシコレステロールに変換する酵素である CYP7A1 による触媒反応である。肝臓コレステロール濃度の調節と同様に、胆汁酸恒常性の調節には数多くのフィードバックメカニズムが関与している（Davis et al, 2002、Kerr et al, 2002、Staudinger et al, 2001）。

胆汁酸及び遊離コレステロールは、肝細胞から胆汁に排泄され、胆嚢に一旦貯蔵される。その後胆汁は腸管腔に放出されて、必須脂溶性ビタミンを含む食物脂肪の吸収を促進する。Parker らは、

マウスを用い、スタチン投与及び非投与条件下で胆汁酸及びステロール代謝に対するPCSK9 LOFの影響を検討した（Parker et al, 2013）。野生型マウス及びPCSK9 KOマウスにスタチンを12週間投与したとき、いずれの群でも血漿中LDL-C濃度が低下したが、肝脂肪濃度には変化がみられなかった（2.6.2.3.6.1項でも言及）。糞便ステロール濃度は野生型マウスとPCSK9 KOマウスで同等であったが、糞便胆汁酸濃度は野生型マウスよりPCSK9 KOマウスでおよそ1.5倍から2倍高かった（Parker et al, 2013）。スタチンを投与した野生型マウス及びPCSK9 KOマウスでは糞便中のステロール及び胆汁酸濃度はともに上昇し、群間で有意差はみられなかった（Parker et al, 2013）。

食物脂肪の摂取は大腸がん発現のリスク因子であるが、これは常在微生物叢により一次胆汁酸から代謝されてできた二次胆汁酸の濃度が上昇するためであると考えられている（Degirolamo et al, 2011）。Parkerの試験はPCSK9 LOFと併用したスタチン投与後に糞便中胆汁酸濃度が上昇したことを示しているが、回腸バイパス手術後等による糞便中胆汁酸負荷量の増加によって結腸癌リスクが上昇していないことから（Kuo et al, 1979、Buchwald et al, 1990）、糞便中の胆汁酸濃度の上昇は有害な影響を及ぼさないかもしれない。また、evolocumabをハムスターに最高100 mg/kg 2週に1回（Q2W）の用量レベルで2年間投与したとき、腫瘍発生率（消化管を含む）の上昇は認められなかった（114976試験、2.6.6項）。さらに、腸管の胆汁酸含有量の変動に伴い、食事からの脂溶性ビタミンの吸収が変化する可能性が考えられるが、evolocumabの臨床試験では、脂溶性ビタミン吸収に対する影響は観察されていない（2.7.4項）。

結論として、LDLRの増加により肝細胞に運ばれたコレステロールは少量の胆汁酸排泄の増加をもたらすが、有害な作用はないと考えられる。この結論は、生涯投与を実施したいずれの非臨床試験でも、evolocumabに関連した肝胆道又は胃腸に毒性が全く認められていないことによっても裏付けられている（2.6.6項）。加えて臨床試験では、肝胆道障害の器官別大分類における有害事象の発現率は、evolocumab群と対照群間でおおむね同様であった（2.7.4項）。

2.6.2.3.7　PCSK9阻害及び血清中LDL-C低下が免疫機能等の肝外系に影響を及ぼす可能性

コレステロールは、増殖及び成長のための細胞膜形成を含め、多くの細胞機能を支える必須分子であり、また、ステロイドホルモンの生合成の前駆体としても必要である（Maxfield and Tabas, 2005）。また、コレステロールの生合成経路の中間体は赤血球を除くすべての哺乳類細胞に存在するが、それらは細胞シグナル伝達経路における主要タンパク質の修飾に必要である。このようにコレステロールは全身で重要な役割を果たすために、evolocumabによるLDL-C低下作用が（局所PCSK9阻害又は低い循環血液中コレステロール濃度を介して）肝外プロセスに、特にリンパ球等の速やかに増殖する細胞に対して、理論上有害な影響を及ぼす可能性が考えられる。

2.6.2.3.7.1　肝外組織における低循環血液中LDL-Cを補うメカニズム

良好な健康状態を維持するためのLDL-Cの最小循環血液中濃度がどの程度であるか、まだ確立されていない。しかし、近年の総説では、西欧諸国及び西欧化した国々の成人集団における循環血液中LDL-C及び総コレステロール（TC）の平均濃度（それぞれおよそ130及び200 mg/dL）は、出生

から青年期に至る早期発育段階における濃度や、世界のほかの先進国の成人における濃度より大幅に高いことが示されている（Hochholzer and Giugliano, 2010、LaRosa et al, 2013）。これらの知見から、良好な健康状態と関連した循環血液中コレステロール濃度とは、西欧諸国の平均よりはるかに低く、PCSK9 LOF 突然変異を持つ人々（Zhao, 2006）及び evolocumab を投与されている患者（2.7.3 項）における濃度程度である可能性がある。

身体のほとんどの器官及び組織の細胞は全身循環からコレステロールを得ることができるが、一般にコレステロールの必要量は内因性生合成により満たされているため、循環血液中のコレステロールに依存することはない（Dietschy et al, 1993）。また、肝外組織におけるコレステロール生合成量は、LDL によって全身循環を通して臓器に運ばれるコレステロール量の 3～5 倍多いと推定されている（Dietschy et al, 1993）。evolocumab はほとんどの肝外組織で LDLR 発現量を増加させると予測されるため（Schmidt et al, 2008）、それらの組織では循環血液中からコレステロールを取り込む能力が高まることになる。しかし非臨床試験では evolocumab を動物に最大で生涯にわたり投与しても、どの肝外組織でも有害事象は認められず（2.6.6 項）、evolocumab で到達した低い血清中 LDL-C 濃度によって肝外組織の機能が低下することはないことが示唆される。さらに臨床試験で報告された有害事象の評価では、肝外組織における作用と関連した安全上のリスクは特定されていない（2.7.4 項）。

一方、腎臓及び副腎では、PCSK9 を阻害しても LDLR 発現は影響されないことが報告されており、そのメカニズムは十分に明らかになっていない（Grefhorst et al, 2008、Luo et al, 2009、Seidah et al, 2012）。副腎では、ステロイドホルモン生合成のためのコレステロール前駆体は HDL によってもたらされるため、evolocumab による PCSK9 阻害によって循環血液中 LDL-C 濃度が低下しても、このプロセスが影響される可能性は低い（Vergeer, 2011、Bochem, 2013）。この結論は、ハムスター及びカニクイザルの両方で受胎能及び生殖パラメータに対する影響が全くなかったことなど、ステロイドホルモン合成減少を示唆する影響がなかったことによっても裏付けられている（2.6.6 項）。また、臨床試験（20110109 試験）では、evolocumab 420 mg を Q4W にて 1 年間投与（単剤療法又はスタチン及びエゼチミブとの併用）することにより LDL-C 濃度が 25 mg/dL 未満に低下した患者でも、ステロイドホルモンの代謝（コルチゾル、ACTH、エストラジオール、FSH、LH、テストステロン）に悪影響は生じなかった（2.7.4 項）。

2.6.2.3.7.2　低血清中 LDL-C が免疫機能に影響する可能性

抗原又はマイトジェン刺激に反応するリンパ球は、クローン増殖時に著しく細胞分裂する。コレステロールは新しい細胞膜形成に必要であり、生合成あるいは外部からの供給によってまかなわれる（Cuthbert and Lipsky, 1984、Cuthbert and Lipsky, 1986、Cuthbert and Lipsky, 1987）。こうしたことから、evolocumab による PCSK9 阻害は免疫機能に影響する可能性が考えられる。T 細胞依存性抗体反応（TDAR）、末梢血免疫表現型検査、ナチュラルキラー細胞活性等の免疫毒性評価項目、並びにリンパ器官の病理組織学的検査及び血液検査などの免疫毒性学的検査について、詳細な検討が行われている。これらの検討では、evolocumab を 420 mg Q4W 投与した患者の 300 倍を超える曝露量でカニクイザルに投与した結果（単独で 6 カ月間、ロスバスタチンとの併用で 3 カ月間）、免疫機能に対する作用は認められなかった。また近年発表された報告では、別の抗 PCSK9 モノクローナル

抗体をアトルバスタチンと併用してカニクイザルに投与したときにもほぼ同様の結果が得られている（Gelzleichter et al, 2014）。

メビノリンによってHMG CoA還元酵素による内因性コレステロール合成を阻害し、さらに外因性LDL濃度を0.5 mg/dLと低くしても、マイトジェン誘発性ヒトリンパ球増殖における膜コレステロール必要量は十分維持されていることが明らかにされている（Cuthbert and Lipsky, 1984、Cuthbert and Lipsky, 1986、Cuthbert and Lipsky, 1987）。このことは、上記の抗PCSK9抗体が免疫機能に作用しないとの知見と一致している。evolocumabを投与した被験者（2.7.3項）における血清中LDL-C濃度は、0.5 mg/dLより1桁以上高い。さらに、リンパ球増殖にとって重要なほかのリポ蛋白（HDLを含む）分画（Cuthbert and Lipsky, 1987）は、evolocumabにより減少しなかった（2.7.3項）。そのため、evolocumabによるPCSK9阻害単独、あるいはスタチンを併用しても、LDL-C濃度の低下は、リンパ球の増殖能力に悪影響を与えるレベルには達しないと考えられる。この結論は、いずれの非臨床試験（2.6.6項）又は臨床試験（2.7.4項）でも、evolocumabが免疫機能に対して影響していないことと一致している。

2.6.2.3.8 PCSK9以外のサブチリシンプロテアーゼへのevolocumabの結合親和性評価

evolocumabのPCSK9及びPCSK9以外のサブチリシンプロテアーゼに対する結合親和性を、ELISA法により検討した（3.2.S.3.1.4.2項）。evolocumabは、ヒト野生型PCSK9及び変異型D374Y PCSK9に対して同程度の親和性で結合したが、PCSK1、PCSK2、PCSK4、PCSK7及びフューリン等のサブチリシンプロテアーゼファミリーに属する他のタンパク質には結合しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

心血管系及び神経行動学的な影響を評価する独立した安全性薬理試験を、カニクイザルにおいてGLPに従い実施した（110150試験、表2.6.2-2）。evolocumabはモノクローナル抗体であり、hERGイオンチャネルに作用しないため（Vargas et al, 2008）、hERGイオンチャネル電流阻害作用の試験は行わなかった。

表2.6.2-2 非臨床安全性薬理試験

試験の標題	試験施設	GLP	Amgen社試験番号
テレメトリーを装着した覚醒カニクイザルにおけるAMG145の単回静脈内投与の心血管系に対する作用（呼吸数測定及び神経行動学的評価を含む）	[redacted]、米国[redacted]	適合	110150

GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令

2.6.2.4.1 テレメトリーを装着した覚醒カニクイザルにおけるevolocumabの単回静脈内投与による心血管系作用についての安全性薬理試験（呼吸数測定及び神経行動学的評価を含む）（110150試験）

テレメトリーを装着した雄のカニクイザルにおいて、evolocumab（300 mg/kg）の単回静脈内投与が覚醒下の心血管系パラメータ、呼吸数及び神経行動学的機能に及ぼす影響を評価した。

心血管系機能の評価のために、テレメトリーデータを投与前少なくとも90分間及び投与後24時間以上持続的に収集した。すべての心電図を定性的及び定量的に評価した結果、正常範囲内であった。PR、QRS、並びにQTc間隔にevolocumabと関連した影響は観察されず、不整脈も認められなかった。心拍数、収縮期、拡張期及び平均血圧、動脈圧、並びに腹腔内体温にevolocumab投与に関連した変化は観察されなかった。

PCSK9と血圧との関連で、培養卵母細胞を用いた*in vitro*試験において、ナトリウムイオンの恒常性及び血圧制御に重要な役割を果たす上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）の分解をPCSK9が促進することが近年報告された（Sharotri, 2012）。しかし、この結果は、第1に上記作用はプロセッシング前のPCSK9の細胞内での作用で（evolocumabはプロセッシング後細胞外に分泌されたPCSK9に作用する）、第2に上記*in vitro*作用は*in vivo*作用には繋がらない（Seidah, 2014）ことから、evolocumab投与とは関連しないと考えられる。また、PCSK9 KOマウスでは、ベースラインの血圧及びアンギオテンシンII誘発時の血圧が野生型と異ならないことから、*in vivo*ではPCSK9が存在しなくてもENaCは増加しない（Seidah, 2014）。更に、機能喪失型PCSK9突然変異（Y142X又はC679X）を持つ人には、高血圧患者が少ない（変異なしの55%に対し37%）（Cohen, 2006）。すなわち、本試験結果及び文献情報から、*in vitro*で観察されるPCSK9のENaCに対する影響は、生理作用と関連しないと考えられた。

動脈圧に重ねた呼吸圧力の変化から計測した呼吸数に、evolocumab投与と関連した変化はなかった。

非拘束（ケージ内）及び拘束動物について神経行動学的な検討を行った結果、evolocumabに関連した作用は観察されなかった。

結論として、テレメトリー装着覚醒カニクイザルにおいて、evolocumab 300 mg/kgを単回静脈内投与した際に、心血管系機能、呼吸数、神経行動学的機能、あるいは体温に影響は認められなかった。静脈内投与後5分のevolocumabの平均血漿中濃度は、臨床試験20101154試験（140 mg Q2W及び420 mg Q4W用量）及び20110271試験（420 mg Q2W用量）のC_{max}と比較すると、各々443、167、及び100倍であった。

上述の結果は、非臨床反復投与毒性試験結果（2.6.6項）、並びに臨床試験において心電図に影響が認められなかった結果（2.7.4項）と矛盾しなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

これまで、薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6　考察及び結論

in vitro の試験から、evolocumab が PCSK9 に対して高い結合親和性を持つこと、LDLR と PCSK9 との結合を阻害すること、培養細胞において LDLR をアップレギュレートし、LDL 取り込みを高めることが実証された。動物モデルでは、evolocumab の投与により血清総コレステロール及び LDL-C が低下し、同時に肝臓の LDLR 蛋白濃度が上昇した。

非臨床モデルを用いた試験及びヒトの遺伝データから、PCSK9 機能が LDLR 及び LDL-C に及ぼす影響が検討されている。ヒトを対象とした試験では、低い血清中 LDL-C 濃度（≤ 100 mg/dL［2.6 mmol/L］）と関連した機能喪失型（LOF）突然変異が特定された（Cohen et al, 2005）。ヘテロ接合型 LOF 突然変異を持つ被験者は、その変異を持たない被験者と比較して血清中 PCSK9 濃度が低く、15 年間の心血管系疾患の発現率が 88%低下するという著しい結果が得られている（Cohen et al, 2006）。また、複合ヘテロ接合体 LOF 突然変異を持つ被験者 2 名が特定され、PCSK9 の完全喪失及び関連する極めて低い血清中 LDL-C 濃度（< 20 mg/dL［0.5 mmol/L］）にもかかわらず、健康上問題は認められなかった（Hooper et al, 2007、Zhao et al, 2006）。

evolocumab の血清中 LDL-C に対する作用は、PCSK9 LOF マウスモデル（Graham et al, 2007、Rashid et al, 2005）及び上記の PCSK9 LOF 突然変異を持つ被験者の表現型と一致している。

evolocumab は、動物を用いた安全性薬理評価においてどのような影響も認められなかった。

以上の様に、これまで得られている結果は、evolocumab には高コレステロール血症の治療薬として可能性があることを示している。

2.6.2.7 参考文献

Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. Expert Opin Drug Saf. 2011;10:373-387.

Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet. 2003;34:154-156.

Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. Hepatology. 2012;55:998-1007.

Agnello V, Gyorgy A, Mutasim E, Knight GB, Zhang Q-X Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci. 1999; 96:12766-12771.

Arora R, Liebo M, Maldonado F. Statin-induced myopathy: the two faces of Janus. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2006;11:105-112.

Awan Z, Dubuc G, Faraj M, Dufour R, Seidah NG, Davignonb J, Rabasa-Lhoret R, Baass A. The effect of insulin on circulating PCSK9 in postmenopausal obese women. Clin Biochem 2014; http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.022.

Baass A, Dubuc G, Tremblay M, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population –based sample of children and adolescents. Clin Chem. 2009;55:1637-1645.

Baker SK, Tarnopolsky MA. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. Clin Invest Med. 2001;24:258-272.

Bartosch B, Cosset FL. Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). Methods Mol Biol. 2009;510:279-293.

Benito-León J, Louis ED, Vega S, Bermejo-Pareja F. Statins and cognitive functioning in the elderly: a population-based study. J Alzheimers Dis. 2010;21:95-102.

Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. J Biol Chem. 2004;279:48865-48875.

Bettermann K, Arnold AM, Williamson J, et al. Statins, risk of dementia, and cognitive function: secondary analysis of the Ginkgo Evaluation of Memory Study. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012;21:436-444.

Beydoun MA, Beason-Held LL, Kitner-Triolo MH, et al. Statins and serum cholesterol's associations with incident dementia and mild cognitive impairment. J Epidemiol Community Health. 2011;65:949-957.

Bingham B, Shen R, Kotnis S, et al. Proapoptotic effects of NARC 1 (=PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase. Cytometry A. 2006;69:1123-1131.

Blacklow SC. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. Curr Opin Struct Biol 2007;17:419–426.

Blom DJ, Hala T, Bolognese M, et al. A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. N Engl J Med. 2014;370:1809-1819.

Bochem AE, Holleboom AG, Romijn JA, et al. High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. J Lipid Res. 2013;54:1698-1704.

Brouwers MCGJ, Troutt JS, van Greevenbroek MMJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. Atherosclerosis 2011;217:263–267.

Brown MS, Herz J, Goldstein JL. LDL-receptor structure: Calcium cages, acid baths and recycling receptors. Nature. 1997;388:629-630.

Brown MS and Goldstein JL. Lowering LDL – not only how low, but how long? Science. 2006;311:1721-1723.

Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. J Lipid Res. 2010;51:3359-3363.

Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes J Clin Invest. 2008;118:403–408.

Brunham LR, Kruit JK, Hayden MR, Verchere LB. Cholesterol in β-cell dysfunction: the emerging connection between HDL cholesterol and type 2 diabetes Curr Diab Rep 2010;10:55–60.

Buchwald H, Varco RL, Matts JP et al Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. New Engl J Med 1990; 323:946-955.

Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. J Gen Virol. 2009;90:1055-1070.

Canuel M, Sun X, Asselin MC, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). Plos One. 2013;8:e64145.

Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, et al. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. J Lipid Res. 2008;49:394-398.

Cariou B, Langhi C, Le Bras M, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. Nutrition & Metabolism 2013;10:4.

Cariou B, Ouguerram K, Zaïr Y, et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29:2191-2197.

Chang CH, Kusama M, Ono S, et al. Assessment of statin-associated muscle toxicity in Japan: a cohort study conducted using claims database and laboratory information. BMJ Open. 2013 Apr 11;3(4). pii: e002040. doi: 10.1136/bmjopen-2012-002040. Print 2013.

Chen J, Ho S, Hayward M, et al. Comprehensive phenotype of mice carrying PCSK9-Y119X null mutation. PCSK9 conference, Nantes, France. 2010.

Chen YQ, Troutt JS, Konrad RJ. PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. Lipids 2014;49:445–455.

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. Lancet. 2010;376:1670-1681.

Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. Nat Genet. 2005;37:161-165.

Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. N Engl J Med. 2006;354:1264-1272.

Costet P, Cariou B, Lambert G, et al. Hepatic PCSK9 expression Is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. J. Biol. Chem. 2006;281:6211-6218.

Culver AL, Ockene IS, Balasubramanian R, et al. Statin use and risk of diabetes mellitus in postmenopausal women in the Women's Health Initiative. Arch Intern Med. 2012;172:144-152.

Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. Nat Struct Mol Biol. 2007;14:413-419.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Modulation of human lymphocyte responses by low density lipoproteins (LDL): enhancement but not immunosuppression is mediated by LDL receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81:4539-4543.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and high density lipoproteins. J Biol Chem. 1986;261:3620-3627.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Provision of cholesterol to lymphocytes by high density and low density lipoproteins: requirement for low density lipoprotein receptors. J Biol Chem. 1987;262;7808-7818.

Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7α-hydroxylase: BARElY missing a SHP. J Lipid Res. 2002;43:533-543.

Dieckmann M, Dietrich MF, Herz J. Lipoprotein receptors – an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. Biol Chem. 2010;391:1341-1363.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J Lipid Res. 1993;34:1637-1659.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol. 2001;12:105-112.

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J Lipids Res. 2004;45:1375-1397.

Dirks AJ, Jones KM. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291:C1208-1212.

Degirolamo C, Modica S, Palasciano G, Moschetta A. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. Trends Mol Med. 2011;17:564-572.

Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1454-1459.

Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu Rev Genet. 2007;41:401-427.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature 2007;446:801–805.

Evans MA, Golomb BA. Statin-associated adverse cognitive effects: survey results from 171 patients. Pharmacotherapy. 2009;29:800-811.

FDA Drug Safety Communication: Important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs 2012 http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm293101.htm.

Feldman HH, Doody RS, Kivipelto M, et al. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. Neurology. 2010;74:956-964.

Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 1997;145:91-98.

Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, et al. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. J Biol Chem. 2007;282:20502-20512.

Frank RT, Abody KS, Najbauer J. Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. Biochim Biophys Acta. 2011; 181G:191-198.

Gelzleichter TR, Halpern W, Erwin R, et al. Combined administration of RG7652, a recombinant human monoclonal antibody against PCSK9, and atorvastatin does not result in reduction of immune function. Tox Sci. 2014; doi: 10.1093/toxsci/kfu093.

Goedeke L, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs: a connection between cholesterol metabolism and neurodegeneration. Neurobiol Dis 2014: doi:10.1016/j.nbd.2014.05.034.

Golomb BA, Criqui MH, White H, Dimsdale JE. Conceptual foundations of the UCSD statin study. Arch Intern Med 2004;164:153–62.

Goulinet S, Chapman MJ. Plasma lipoproteins in the Golden Syrian hamster (Mesocricetus auratus): heterogeneity of apoB- and apoA-l-containing particles. J Lipid Res. 1993;34:943-959.

Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. J Lipid Res. 2007;48:763-767.

Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. J Lipid Res. 2008;49:1303-1311.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. Circulation. 2004;110:227-239.

Gu H-M, Adijiang A, Mah M, Zhang D-W. Characterization of the role of EGF-A of low density lipoprotein receptor in PCSK9 binding. J Lipid Res 2013;54:3345-3357.

Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, et al., The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. Cell Metabolism 2014;9:310–318.

Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, Jacobson TA. An assessment by the statin intolerance panel: 2014 update J Clin Lipidol 2014; 8:S72–S81.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:101-112.

Harper CR, Jacobson TA. The broad spectrum of stain myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. Curr Opin Lipidol. 2007;18:401-408.

Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. Ann Rev Biochem 2002;71;405-434.

Herz J. Apolipoprotein E receptors in the nervous system. Curr Opin Lipidol. 2009;20:190-196.

Hochholzer W, Giugliano RP. Lipid lowering goals: back to nature? Ther Adv Cardiovasc Dis. 2010;4:185-191.

Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. Atherosclerosis. 2007:193:445-448.

Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci. 2007:32:71-77.

Jonas MC, Costantini C, Puglielli L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. EMBO Rep. 2008;9:916-922.

Jones AR, Shusta EV.Antibodies and the blood-brain barrier In: An Z, ed. Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc. 2009; Ch21:483-502.

Jukema JW, Cannon CP, de Craen AJM, Westendorp RGJ, Trompet S. The controversies of statin therapy: weighing the evidence. J Am Coll Cardiol. 2012;60:875–881.

Kappelle PJWH, Lambert G,Dullaart RPF. Plasma proprotein convertase subtilisin–kexin type 9 does not change during 24 h insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients. Atherosclerosis. 2011;214: 432–435.

Kerr TA, Saeki S, Schneider M, et al. Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. Dev Cell. 2002;2:713-720.

Kim J, Castellano JM, Jiang H, et al. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. Neuron. 2009;64:632-644.

Klopfleisch S, Merkler D, Schmitz M, et al. Negative impact of statins on oligodendrocytes and myelin formation in vitro and in vivo. J Neurosci. 2008;28:13609–13614.

Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, et al. Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia – the MENDEL-2 randomized, controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. J Am Coll Cardiol. 2014;63:2531-2540

Koren MJ, Scott R, Kim JB, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. Lancet. 2012;380:1995-2006.

Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. Am J Hum Genet. 2006;78:410-422.

Kuo PT, Hayase K, Kostis JB, Moreyra AE. Use of combined diet and colestipol in long term (7-7.5 years) treatment of patients with type II hyperlipoproteinemia. Circulation. 1979;59:199-211.

Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, et al. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:1820-1825.

Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, et al. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. Cell Mol Life Sci. 2012;69:1903-1916.

Labonté P, Begley S, Guévin C, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. Hepatology. 2009;50:17-24.

Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:2537-2543.

Langhi C, Le May C, Gmyr V, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2009;390:1288-1293.

LaRosa JC, Pedersen TR, Somaratne R, Wasserman SM. Safety and effect of very low levels of low-density lipoprotein cholesterol on cardiovascular events. Am J Cardiol. 2013;111:1221-1229.

Lebrec, H, Molinier B, Boverhof D, et al. The T-cell-dependent antibody response assay in nonclinical studies of pharmaceuticals and chemicals: Study design, data analysis, interpretation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2014;69:7-21.

Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. J. Lipid Res. 2010;51:2611-2618.

Luo Y, Warren L, Xia D, et al. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. J Lipid Res. 2009;50:1581-1588.

Mallinson JE, Constantin-Teodosiu D, Glaves PD, et al. Pharmacological activation of the pyruvate dehydrogenase complex reduces statin-mediated upregulation of FOXO gene targets and protects against statin myopathy in rodents. J. Physiol. 2012;590:6389-6402.

Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 2005;438:612-621.

Mayne J, Dewpura T, Raymond A, et al. Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. Lipids Health Dis. 2008;7:22.

Mazumdar B, Banerjee A, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. Hepatology. 2011;54:1149-1156.

Mbikay M, Sirois F, Mayne J, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. FEBS Lett. 2010;584:701-706.

McGuinness B, O'Hare J, Craig D, et al. Cochrane review on "Statins for the treatment of dementia". Int J Geriatr Psychiatry. 2013;28:119-126.

Miron VE, Zehntner SP, Kuhlmann T, et al. Statin therapy inhibits remyelination in the central nervous system. Am. J. Pathol. 2009;174:1880-1890.

Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. J. Hepatol. 2007;46:411-419.

Muldoon MF, Barger SD, Ryan CM, et al. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. Am J Med. 2000;108:538-546.

Muldoon MF, Ryan CM, Sereika SM, et al. Randomized trial of the effects of simvastatin on cognitive functioning in hypercholesterolemic adults. Am J Med. 2004;117:823-829.

Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. Arch Biochem Biophys. 2008;470:111-115.

Nguyen MA, Kosenko T, Lagace TA. Internalized PCSK9 dissociates from recycling LDL receptors in PCSK9-resistant SV-589 fibroblasts. J Lipid Res. 2014;55:266-275.

Ooba N, Sato T, Wakana A, et al. A prospective stratified case-cohort study on statins and multiple adverse events in Japan. PLoS One. 2014 e96919. doi: 10.1371/journal.pone. 0096919. eCollection 2014.

折井孝男、下堂薗権洋、石本敬三、他.平成 21 年度学術委員会学術第 2 小委員会報告 薬剤疫学的手法を利用した医薬品適正使用に関する研究（最終報告）. 日本病院薬剤師会雑誌,2010; 46, 993-997.

Orsi A, Sherman O, Woldeselassie Z. Simvastatin-associated memory loss. Pharmacotherapy. 2001;21:767-769.

Parker BA, Polk DM, Rabdiya V, et al. Changes in memory function and neuronal activation associated with atorvastatin therapy. Pharmacotherapy. 2010;30(6):236e-240e.

Parker RA, Garcia R, Ryan CS, et al. Bile acid and sterol metabolism with combined HMG CoA reductase and PCSK9 suppression. J Lipid Res. 2013;54:2400-2409.

Persson L, Cao G, Ståhle L,et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2666-2672.

Persson L, Gälman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. Endocrinology. 2009;150:1140-1146.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998;282:938-941.

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, et al. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E (LDL) receptors in the brain. J Biol Chem. 1987;262:14352-14360.

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood- nerve and blood- brain barriers. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 ;91:5705-5709.

Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, et al. Implication of the convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. J. Neurochem. 2006;98:838-850.

Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. J Biol Chem. 2008;283:2363-2372.

Postmus I, Trompet S, de Craen AJ, et al. PCSK9 SNP rs11591147 is associated with low cholesterol levels but not with cognitive performance or noncardiovascular clinical events in an elderly population. J Lipid Res. 2013;54:561-566.

Raal F, Scott R, Somaratne R, et al. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. Circulation. 2012;126:2408-2417.

Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, et al. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. Diabetes Care. 2009;32:1924-1929.

Ramanathan A, Gusarova V, Kyratsous C. Role of alirocumab (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibody) on CD81 levels and hepatitis C virus entry into hepatocytes. [abstract] American Heart Association 2013; Abstract 12052.

Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:5374-5379.

Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W. Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. Mol Neurodegener. 2011;6:30.

Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. Hum Mol Genet. 2010;19:2068-2078.

Rhinn H, Fujita R, Qiang L, et al. Integrative genomics identifies APOE e4 effectors in alzheimer's disease. Nature. 2013;500:45-50.

Richardson K, Schoen M, French B, et al. Statins and cognitive function: a systematic review. Ann Intern Med. 2013;159:688-697.

Rojas-Fernandez CH, Goldstein LB, Levey AI, et al. An assessment by the Statin Cognitive Safety Task Force: 2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S5-S16.

Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, et al. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. J Clin Lipidol. 2014;8:S58-S71.

Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:785-791.

Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. J Lipid Res. 2011;52:1383-1391.

Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. Annu Rev Biochem. 2003;72:137-174.

Saher G, Simons M. Cholesterol and myelin biogenesis. In: J.R. Harris (ed.), Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins Subcellular Biochemistry. Springer Science+Business Media B.V. 2010;51:489-508. DOI 10.1007/978-90-481-8622-8_18.

Sampson UK, Linton MF, Fazio S. Are statins diabetogenic? Curr Opin Cardiol. 2011;26:342-347.

Sattar N, Preiss D, Murray HM, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. Lancet. 2010;375:735-742.

Sattar N, Taskinen MR. Statins are diabetogenic – myth or reality? Atheroscler Suppl. 2012;13:1-10.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J. 2002;21:5017-5025.

Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, et al. Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 2004;194:10-23.

Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, et al. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2008;370:634-640.

Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. Circ Res. 2014;114:1022-1036.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:928-933.

Seidah NG, Poirier S, Denis M, et al. Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation. PLoS One. 2012;7:e41865.

Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov. 2012;11: 367-383.

Shan L, Pang L, Zhang R, et al. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375:69-73.

Sharotri V, Collier DM, Olson DR, et al. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). J Biol Chem. 2012;287:19266-19274.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:3369-3374.

Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, et al. Effect of the PCSK99 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. Circulation. 2013;128:2113-2120.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:8098-8102.

Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS, et al. Statins and cognition: a systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. Mayo Clin Proc. 2013;88:1213-1221.

Syed GH, Tang H, Khan M, et al. Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. J Virol. 2014;88:2519-2529.

Taha DA, De Moor CH, Barrett DA, Gershkovich P. Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies. Transl Res. 2014; S1931-5244(14)00034-6. doi: 10.1016/j.trsl.2014.01.013.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. Cell. 2005;120:545-555.

Thiel MA, Coster DJ, Williams KA. The potential of antibody-based immunosuppressive agents for corneal transplantation. Immunol Cell Biol. 2003; 81:93-105.

Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. JAMA. 2003;289:1681-1690.

Thompson PD, Parker B. Statins, exercise, and exercise training. J Am Coll Cardiol. 2013;62:715-716.

Triguero D, Buciak JB, Yang J, Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:4761-4765.

Trompet S, van Vliet P, de Craen AJ, et al. Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. J Neurol. 2010;257:85-90.

Unger RH. Lipotoxic diseases. Annu Rev Med. 2002;53:319-336.

Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, et al. Molecular basis of statin-associated myopathy. Atherosclerosis. 2009;202:18-28.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58:72-76.

Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. J Mol Neurosci. 2004;23:105-114.

Vere CC, Streba CT, Streba L, Rogoveanu I. Lipid serum profile in patients with viral liver cirrhosis. Med Princ Pract. 2012;21:566-568.

Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, et al. Genetic variant of the scavenger receptor B1 in humans. N Engl J Med. 2011;364:136-145.

Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BM, Doraiswamy PM. Statin-associated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. Pharmacotherapy. 2003;23:871-880.

Westwood FR, Bigley A, Randall K, et al. Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fiber selectivity. Toxicol Pathol. 2005;33:246-257.

Westwood FR, Scott RC, Marsden AM, et al. Rosuvastatin: characterization of induced myopathy in the rat. Toxicol Pathol. 2008;36:345-352.

Wu JE, Basso F, Shamburek RD, et al. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. J Biol Chem. 2004;279:22913-22925.

Yu JT, Tan L, Hardy J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An update. Annu Rev Neurosci. 2014; DOI: 10.1146/annurev-neuro-071013-014300.

Yu YJ, Watts RJ. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. Neurotherapeutics. 2013;10:459-472.

Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. Hepatology. 2008;48:646-654.

Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. Neuroepidemiology. 2004;23:94-98.

Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, et al. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. Arch Gen Psychiatry. 2005;62:217-224.

Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. J Biol Chem. 2007;282:18602-18612.

Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. Am J Hum Genet. 2006;79:514-523.

Zhong Z, Ewers M, Teipel S, et al. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. Arch Gen Psychiatry. 2007;64:718-726.

Zhou B, Teramukai S, Fukushima M. Prevention and treatment of dementia or Alzheimer's disease by statins: a meta-analysis. Dement Geriatr Cogn Disord. 2007;23:194-201.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron. 2008;57:178-201.

目次

2.6.3　薬理試験概要表 2

表一覧

表 2.6.3-1　効力を裏付ける試験－*in vitro* 試験被験物質：evolocumab 2
表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験－*in vivo* 試験被験物質：evolocumab 4
表 2.6.3-3　効力を裏付ける試験－追加の *in vivo* 試験被験物質：evolocumab 5
表 2.6.3-4　副次的薬理試験被験物質：evolocumab 9
表 2.6.3-5　安全性薬理試験被験物質：evolocumab 10
表 2.6.3-6　薬力学的薬物相互作用試験被験物質：evolocumab 10

2.6.3　薬理試験概要表

表 2.6.3-1　効力を裏付ける試験－*in vitro* 試験
被験物質：evolocumab

試験の標題 （報告書番号）	試験の種別	試験系	目的	方法	結果の要約
ヒト、カニクイザル、ハムスター、マウスの PCSK9 に対する AMG145 の結合活性 (R20080178)	Non-GLP *in vitro*	BIAcore 平衡結合アッセイ	ヒト（WT 及び D374Y）、カニクイザル、ハムスター、マウスの PCSK9 に対する evolocumab の K_D 値を算出する	ヒト（WT 及び D374Y）、カニクイザル、ハムスターの PCSK9 に対する evolocumab の親和性を、BIAcore（表面プラズモン共鳴技術）により評価した。K_D 値は、KinExA Pro ソフトウェアによる N 曲線一部位相同結合モデルを用いて競合曲線の非線形回帰から得た。 マウス PCSK9 に対する evolocumab の親和性は、BIAcore を用いて結合速度反応試験を実施した。K_D 値は、BIAevaluation ソフトウェアの 1:1 結合反応速度モデルを用いたグローバルフィッティングから算出した。	ヒト WT、ヒト D374Y、カニクイザル、ハムスター、及びマウスの PCSK9 に対する evolocumab の K_D 値は、それぞれ 16 pmol/L、7 pmol/L、8 pmol/L、14 pmol/L、及び 17000 pmol/L であった。
LDLR と PCSK9 の結合活性における AMG145 と 31H4.2 の In Vitro IC_{50} 測定 (R20080177)	Non-GLP *in vitro*	ELISA による、精製組換えタンパク質結合試験	PCSK9 の LDLR への結合に対する evolocumab の阻害活性を測定する	ヤギ抗 LDLR 抗体を用いて組換え LDLR 蛋白を 384 ウェルプレートにコーティングした。 様々な量の evolocumab でインキュベートしたビオチン化 D374Y PCSK9 又はビオチン化 WT PCSK9 を、LDLR でコーティングしたプレートに添加した。LDLR に結合したビオチン化 D374Y PCSK9 又は WT PCSK9 の量を、ストレプトアビジン-HRP 及び TMB 基質を用いて検出した。（続く）	evolocumab は LDLR への PCSK9 の結合を阻害した。D374Y PCSK9 及び WT PCSK9 を用いた際の evolocumab の平均（± SD）IC_{50} 値は、それぞれ 0.25 ± 0.16 nmol/L 及び 1.94 ± 0.32 nmol/L であった。

注：31H4.2 は R20080177 試験及び R20080176 試験において研究目的のために使用された抗 PCSK9 モノクローナル抗体である。

略語：BODIPY = 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid、D374Y PCSK9 = 機能獲得変異した PCSK9、EC_{50} = 半数効果濃度、ELISA = 酵素免疫測定法、evolocumab の以前の名称は AMG 145、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HRP = horse radish peroxidase、IC_{50} = 半数阻害濃度、K_D = 解離平衡定数、LDL = 低比重リポ蛋白、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、TMB = 3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン遊離塩基、WT = 野生型

表 2.6.3-1　効力を裏付ける試験－*in vitro* 試験
被験物質：evolocumab（続き）

試験の標題 （報告書番号）	試験の種別	試験系	目的	方法	結果の要約
(R20080177) （続き）				反応は 1N HCl で停止させ、450 nm の吸光度を測定した。GraphPadPrism ソフトウェアを用い、吸光度を log[evolocumab 濃度]に対してプロットして IC_{50} 値を算出した。	
HepG2 細胞の LDL 取り込み測定における AMG145 と 31H4.2 の In Vitro EC_{50} 測定 (R20080176)	Non-GLP *in vitro*	ヒト肝細胞株 HepG2 細胞系	細胞の LDL 取り込み試験における evolocumab の作用を評価する	あらかじめ様々な濃度の evolocumab と反応させた D374Y PCSK9 又は WT PCSK9 を、BODIPY-LDL とともに、HepG2 細胞とインキュベートした。 3 時間の培養後、細胞の BODIPY-LDL 取り込み量を、Safire プレートリーダーを用いて測定した。 EC_{50} 値は Graphpad Prism シグモイド型用量反応（可変勾配）曲線プログラムを用いて算出した。	HepG2 細胞において、evolocumab は PCSK9 を介した LDL 取り込みの減少を阻害した。 D374Y PCSK9 及び WT PCSK9 を用いた際の、evolocumab の平均（± SD）EC_{50} 値はそれぞれ 12.7 ± 4.0 nmol/L 及び 129.6 ± 22.3 nmol/L であった。
HepG2 細胞の LDL 受容体濃度に対する抗 PCSK9 抗体とスタチン併用の作用 (R20080222)	Non-GLP *in vitro*	ヒト肝細胞株 HepG2 細胞系	HepG2 細胞の LDLR 蛋白濃度に対する evolocumab・スタチン（メビノリン）併用の作用を測定する	HepG2 細胞を、様々な濃度の evolocumab 及び／又はスタチン（メビノリン）で 48 時間処置した。 総 LDLR 蛋白濃度を Western hybridization 法により、また細胞表面 LDLR 濃度をフローサイトメトリーによりそれぞれ測定した。 また、細胞溶解物の PCSK9 の蛋白濃度を Western hybridization 法により測定し、培地への PCSK9 分泌量を ELISA で測定した。	HepG2 細胞を evolocumab 又はメビノリンで 48 時間処理した結果、細胞溶解物及び細胞表面の LDLR 蛋白濃度は上昇した。 evolocumab とメビノリンを併用すると、どちらか一方のみの場合と比較して LDLR 蛋白濃度はより上昇した。

注：31H4.2 は R20080177 試験及び R20080176 試験において研究目的のために使用された抗 PCSK9 モノクローナル抗体である。

略語： BODIPY = 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid、D374Y PCSK9 = 機能獲得変異した PCSK9、EC_{50} = 半数効果濃度、ELISA = 酵素免疫測定法、evolocumab の以前の名称は AMG 145、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HRP = horse radish peroxidase、IC_{50} = 半数阻害濃度、K_D = 解離平衡定数、LDL = 低比重リポ蛋白、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、TMB = 3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン遊離塩基、WT = 野生型

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験－*in vivo* 試験
被験物質：evolocumab

試験の標題 （報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
ゴールデンシリアンハムスターにおける血清コレステロールと肝臓LDLRの調節に対するAMG145の単回皮下投与の作用 (R20080179)	Non-GLP *in vivo*	ゴールデンシリアンハムスター	ゴールデンシリアンハムスターの血清脂質パラメータ及び肝臓LDLR蛋白発現に対するevolocumabの単回皮下注射の作用を検討する	雄性ゴールデンシリアンハムスターにevolocumab（3、10、又は30 mg/kg）又は対照の抗KLH抗体（30 mg/kg）を皮下投与した。投与後様々な時点で安楽死させ、血液及び肝臓組織のサンプルを採取した。また、ハムスターの一部は0時点で安楽死させて血液及び肝臓組織のサンプルを採取した。血清TC、non-HDL-C、及びHDL-Cを測定した。血清中の抗体濃度も測定した。また、肝臓組織サンプルは、ホモジネートしてWestern hybridizationによりLDLR蛋白量を測定した。	雄性ゴールデンシリアンハムスターにevolocumabを単回皮下投与したところ、肝臓LDLR蛋白濃度は上昇し、血清中のnon-HDL-C、HDL-C、TCが優位に低下した（$P < 0.05$）。投与した3用量間で、作用持続期間に相違が認められた。
カニクイザルの血清脂質に対するAMG145の単回皮下投与の作用 (R20090025)	Non-GLP *in vivo*	カニクイザル	雄性カニクイザルの血清脂質濃度に対するevolocumabの単回皮下投与の作用を検討する	未処置の雄性カニクイザルにevolocumab（0.05、0.2、又は0.5 mg/kg）又はプラセボを投与し、14日間採血を行った。血清中LDL-C、HDL-C、TC、トリグリセリドを測定した。血清中の抗体濃度も測定した。	evolocumab 0.2 mg/kg及び0.5 mg/kgを投与したカニクイザルにおいては、LDL-C及びTCの低下について統計的な有意差が認められたが、0.05 mg/kgを投与したカニクイザルにおいては認められなかった。HDL-C又はトリグリセリドは、いずれの用量においても、統計的に有意な変化は認められなかった。

略語：evolocumabの以前の名称はAMG 145。GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HDL-C＝高比重リポ蛋白コレステロール、KLH＝キーホールリンペットヘモシニアン、LDL-C＝低比重リポ蛋白コレステロール、LDLR＝低比重リポ蛋白受容体、non-HDL-C＝非高比重リポ蛋白コレステロール、PCSK9＝プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン9型、SC＝皮下、TC＝総コレステロール、VLDL-C＝超低比重リポ蛋白コレステロール

表 2.6.3-3　効力を裏付ける試験－追加の *in vivo* 試験
被験物質：evolocumab

試験の標題（報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
アデノ随伴ウイルスによってヒト PCSK9 を発現させた雄性 C57Bl/6 マウスにおける、抗 PCSK9 抗体 1A12、23B5、及び AMG145 のコレステロール低下作用 (R20090001)	Non-GLP *in vivo*	C57Bl/6 マウス	AAV によりヒト PCSK9 を発現させた C57Bl/6 マウスの血清脂質パラメータに対する、抗 PCSK9 抗体及び evolocumab 単回皮下投与の影響を検討する	ヒト PCSK9 をコードした AAV の感染によりヒト PCSK9 を発現させて、血清コレステロール濃度を上昇させた雄性 C57BL/6 マウスを作製した。このマウスに 23B5、1A12、evolocumab 又は抗 KLH 抗体（対照群）30 mg/kg を投与した。マウスは抗体投与後 1～5 日で安楽死させ、分析用に採血を行った。血清中の non-HDL-C、HDL-C、TC を測定した。血清中の抗体濃度も測定した。	マウスにおいて、AAV によりヒト PCSK9 を発現させることにより、non-HDL-C（LDL-C 及び VLDL-C）の血清中濃度は約 51 mg/dL となった。23B5、1A12 又は evolocumab を 30 mg/kg 投与後、最初の 48 時間で、対照群と比較して non-HDL-C 及び TC の有意な低下がみられた。72 時間後までに、コレステロール濃度は対照群とほぼ同じ濃度に回復した。

略語：AAV = アデノ随伴ウイルス、ApoB = アポリポ蛋白 B、evolocumab の以前の名称は AMG 145。GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HDL-C = 高比重リポ蛋白コレステロール、KLH = キーホールリンペットヘモシニアン、LDL-C = 低比重リポ蛋白コレステロール、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、non-HDL-C = 非高比重リポ蛋白コレステロール、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、SC = 皮下、TC = 総コレステロール、VLDL-C = 超低比重リポ蛋白コレステロール

表 2.6.3-3　効力を裏付ける試験－追加の *in vivo* 試験
被験物質：evolocumab（続き）

試験の標題（報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
雄性カニクイザルの血清コレステロールに対する 8A3、23B5、及び AMG145 の作用 (R20090266)	Non-GLP *in vivo*	カニクイザル	雄性カニクイザルの血清脂質濃度に対する様々な抗 PCSK9 抗体及び evolocumab 単回皮下投与の影響を検討する	未処置の雄性カニクイザルを血清コレステロール濃度に基づき、各投与群に割付けた。T = 0 時点に絶食下でベースライン採血を行った後、カニクイザルに抗 KLH 抗体（対照群）、evolocumab、8A3 又は 23B5（0.5 mg/kg）を皮下投与し、14 日間採血を行った（36 時間後を除き、すべて絶食）。血清中 TC、LDL-C、HDL-C、トリグリセリド、ApoB を測定した。血清中の evolocumab 抗体濃度も測定した。	抗 KLH 抗体（対照群）を投与したカニクイザルと比較して、evolocumab を投与したカニクイザルでは TC 及び LDL-C が有意に低下した。この有意な低下は投与後 24 時間までに認められ、6 日後まで持続した。evolocumab による最大低下反応が認められたのは投与 3 日後であった（対照群と比較して TC が 31%、LDL-C が 72%低下）。7 日後までに LDL-C 及び TC の統計的な有意差は消失した。HDL-C 又はトリグリセリドは、いずれの評価時点においても統計的に有意な変化は認められなかった。ApoB は、LDL-C と同様に一過性の低下が認められた。

略語：AAV = アデノ随伴ウイルス、ApoB = アポリポ蛋白 B、evolocumab の以前の名称は AMG 145。GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HDL-C = 高比重リポ蛋白コレステロール、KLH = キーホールリンペットヘモシニアン、LDL-C = 低比重リポ蛋白コレステロール、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、non-HDL-C = 非高比重リポ蛋白コレステロール、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、SC = 皮下、TC = 総コレステロール、VLDL-C = 超低比重リポ蛋白コレステロール

表 2.6.3-3　効力を裏付ける試験－追加の *in vivo* 試験
被験物質：evolocumab（続き）

試験の標題 （報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
アデノ随伴ウイルスによってヒト PCSK9 を発現させた雄性 C57Bl/6 マウスにおける、抗 PCSK9 抗体 8A3、1A12、9C9、及び AMG145 のコレステロール低下作用 (R20100042)	Non-GLP *in vivo*	C57Bl/6 マウス	AAV によりヒト PCSK9 を発現させた C57Bl/6 マウスの血清脂質パラメータに対する、抗 PCSK9 抗体及び evolocumab 単回皮下投与の影響を検討する	ヒト PCSK9 をコードした AAV の感染によりヒト PCSK9 を発現させて、血清コレステロール濃度を上昇させた雄性 C57BL/6 マウスを作製した。このマウスに 8A3、9C9、1A12、evolocumab 又は抗 KLH 抗体（対照群）30 mg/kg を投与した。マウスは抗体の投与後 1～3 日で安楽死させ、分析用に採血を行った。血清中の non-HDL-C、HDL-C、TC を測定した。血清中の抗体濃度も測定した。	マウスにおいて、AAV によりヒト PCSK9 を発現させることにより、non-HDL-C（LDL-C 及び VLDL-C）の血清中濃度は約 52 mg/dL となった。8A3、9C9、1A12 又は evolocumab を 30 mg/kg 投与 後、最長 3 日間、対照群と比較して non-HDL-C 及び TC の有意な低下が認められた。

略語：AAV = アデノ随伴ウイルス、ApoB = アポリポ蛋白 B、evolocumab の以前の名称は AMG 145。GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HDL-C = 高比重リポ蛋白コレステロール、KLH = キーホールリンペットヘモシニアン、LDL-C = 低比重リポ蛋白コレステロール、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、non-HDL-C = 非高比重リポ蛋白コレステロール、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、SC = 皮下、TC = 総コレステロール、VLDL-C = 超低比重リポ蛋白コレステロール

表 2.6.3-3　効力を裏付ける試験－追加の *in vivo* 試験
被験物質：evolocumab（続き）

試験の標題（報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
雄性カニクイザルの血清脂質に対する AMG 492 単回皮下投与の作用 (R20110022)	Non-GLP *in vivo*	カニクイザル	雄性カニクイザルの血清脂質濃度に対する抗 PCSK9 抗体及び 8A3、AMG 492、evolocumab の単回皮下投与の影響を検討する	未処置の雄性カニクイザルを血清コレステロール濃度に基づき、各投与群に割付けた。T = 0 時点に、絶食下でベースライン採血を行った後、カニクイザルに抗 KLH 抗体（対照群）、evolocumab、8A3 又は AMG 492（0.5 mg/kg）を皮下投与し、45 日間採血を行った。血清中 TC、LDL-C、HDL-C、トリグリセリド及び抗体の濃度を測定した。また、血清 ApoB 濃度を最初の 33 日間観察した。	抗 KLH 抗体（対照群）を投与したカニクイザルと比較して、evolocumab を投与したカニクイザルでは LDL-C が有意に低下した。TC 及び ApoB の変化は LDL-C の変化に類似していた。evolocumab の投与により、注射 18 日後に HDL-C が低下した。

略語：AAV = アデノ随伴ウイルス、ApoB = アポリポ蛋白 B、evolocumab の以前の名称は AMG 145。GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、HDL-C = 高比重リポ蛋白コレステロール、KLH = キーホールリンペットヘモシニアン、LDL-C = 低比重リポ蛋白コレステロール、LDLR = 低比重リポ蛋白受容体、non-HDL-C = 非高比重リポ蛋白コレステロール、PCSK9 = プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型、SC = 皮下、TC = 総コレステロール、VLDL-C = 超低比重リポ蛋白コレステロール

表 2.6.3-4　副次的薬理試験
被験物質：evolocumab

試験の標題 （報告書番号）	試験の種別	動物種	目的	方法	結果の要約
（試験未実施）	NA	NA	NA	NA	NA

略語：NA＝該当なし

表 2.6.3-5　安全性薬理試験
被験物質：evolocumab

動物種／系統 試験の種別	投与経路	投与期間	投与量 (mg/kg)	性及び群毎の 動物数	NOAEL (mg/kg)	特記すべき所見	Amgen 社 試験番号
サル／カニクイザル 単回投与、テレメトリー 安全性薬理試験	IV	溶媒又は evolocumab を単回投与し、投与後 1 日のデータを収集	0 及び 300	4M	300	evolocumab は、心血管系機能、呼吸数、神経学的行動、体温に影響を与えなかった。	110150 (GLP)

略語：GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令、IV = 静脈内投与、M = 雄、NOAEL = 無毒性量

表 2.6.3-6　薬力学的薬物相互作用試験
被験物質：evolocumab

試験の標題	試験の種別／標題	動物種	目的	方法	結果の要約
（試験未実施）	NA	NA	NA	NA	NA

略語：NA = 該当なし